



UNIVERSITE PARIS-DESCARTES

FACULTE DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES ET BIOLOGIQUES

# THESE

pour l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE PARIS DESCARTES

Discipline : Biochimie et Biologie Moléculaire

Ecole Doctorale : Médicament Toxicologie Chimie Environnement

présentée et soutenue publiquement

par Laetitia LE COINTRE épouse MAUGE

le 25 Octobre 2012

**Physiologie du compartiment endothélial circulant  
dans l'hypertension artérielle pulmonaire  
et perspectives de développement d'un produit de thérapie cellulaire.**

JURY :

Madame le Professeur Florence SABATIER

Rapporteur

Monsieur le Professeur Philippe NGUYEN

Rapporteur

Monsieur le Docteur Pierre-Louis THARAUX

Examineur

Monsieur le Docteur David MONTANI

Examineur

Madame le Professeur Pascale GAUSSEM

Directeur de Thèse

Monsieur le Professeur David SMADJA

Directeur de Thèse

## **REMERCIEMENTS**

Je remercie tout d'abord les professeurs Pascale Gaussem et David Smadja pour m'avoir guidée tout au long de ce travail et m'avoir fait profiter de leur expérience et leur culture scientifique.

Je remercie également le Pr Anne-Marie Fischer de m'avoir accueillie au sein du service d'Hématologie biologique de l'Hôpital Européen Georges Pompidou pendant une grande partie de ce travail.

Je remercie le service d'Hématologie Biologique de l'hôpital de La conception de Marseille pour leurs précieux conseils et leur collaboration.

J'adresse également mes remerciements aux équipes cliniques qui ont participé à ces projets, le Dr Maryline Lévy, pneumologue à l'Hôpital Necker, le Dr Olivier Sanchez et le Pr Dominique Israël-Biet du service de Pneumologie de l'HEGP. Merci également au Pr Boutouyrie du service de Pharmacologie et à l'URC pour leur participation au protocole Vimopeil.

Un grand merci à tous les membres de l'équipe de cytométrie en flux de l'HEGP et plus particulièrement Florence pour son aide et sa participation aux techniques d'IMS et de cytométrie, ainsi que pour sa bonne humeur. Je remercie également mon collègue et compagnon de thèse Clément d'Audigier pour son soutien, ses services et son humour, ainsi que Sébastien et Véronique pour leur aide et leur gentillesse.

Je remercie tous les membres, rapporteurs et examinateurs d'avoir accepté de faire partie du jury.

Je remercie l'équipe de l'unité UMRS765 et plus particulièrement Blandine Dizier avec qui tous les travaux d'expérimentation animale ont été réalisés.

Je remercie également Coralie et le PARCC pour leur collaboration.

Un très grand merci à mon amie Sylvia et à ma soeur Stéphanie pour leur précieuse aide, ces derniers mois surtout, ainsi qu'à Gaëtan et Elodie, mes amis, ma belle famille et bien sûr mes parents pour leur soutien.

Enfin je remercie mon mari qui a toujours été très présent, ainsi que mes adorables petites filles.

## RESUME

L'endothélium joue un rôle primordial dans le développement et le maintien des multiples fonctions vasculaires. Il est ainsi largement impliqué dans des situations pathologiques comme les maladies cardio-vasculaires. La description de marqueurs endothéliaux circulants a permis une exploration non invasive de l'endothélium. Notre équipe s'est intéressée principalement aux cellules endothéliales circulantes (CEC), dont le taux reflète la lésion ou l'activation de l'endothélium, et aux progéniteurs endothéliaux circulants (PEC), marqueurs de régénération endothéliale. La découverte en 1997 par Asahara de la présence chez l'adulte de ces PEC, participant à la formation de nouveaux vaisseaux par vasculogénèse, a ouvert de nouvelles perspectives, notamment pour la thérapie cellulaire des pathologies ischémiques.

Ce travail a consisté à développer les méthodes d'étude de ces cellules dans plusieurs contextes. Tout d'abord, nous avons exploré l'utilité de ces marqueurs dans la physiopathologie de l'hypertension artérielle pulmonaire (HTAP). Puis nous avons analysé le potentiel de mobilisation des progéniteurs endothéliaux à partir de la paroi vasculaire lors d'une ischémie locale chez des volontaires sains dans le cadre du développement d'un produit de thérapie cellulaire autologue.

Une partie de ce projet a été de mettre en place et d'optimiser les techniques d'étude de ces marqueurs. Les CEC ont été quantifiées par immunoséparation magnétique (IMS), technique mise au point en 1992 (Dignat-George 1992) et transférée dans notre laboratoire. La quantification des PEC a été réalisée par cytométrie en flux et par culture cellulaire. En culture, deux types de PEC sont décrits : les PEC précoces, dont l'origine est monocyttaire et pour lesquels la culture est déjà standardisée, et les « Endothelial Colony Forming Cells » (ECFC), seules cellules présentant des caractéristiques de cellules endothéliales progénitrices et pouvant être proposées comme produit de thérapie cellulaire. Nous avons optimisé la quantification des ECFC en culture en étudiant l'effet de diverses matrices et de la densité d'ensemencement des cellules mononucléées issues du sang total sur l'obtention de ces cellules et leurs propriétés angiogènes.

La dysfonction endothéliale a été décrite comme un élément central dans le développement de l'HTAP dont le diagnostic repose sur la mesure de la pression artérielle pulmonaire par cathétérisme cardiaque droit. En l'absence de marqueur biologique non invasif dans cette maladie, nous avons quantifié les CEC et les progéniteurs circulants dans deux études. Une étude réalisée chez des patients adultes a montré une augmentation

spécifique des CEC dans l'HTAP et non dans l'hypertension pulmonaire thromboembolique chronique. Ainsi les CEC semblent être le reflet des lésions endothéliales pulmonaires et non de la sévérité clinique des patients. L'autre étude a montré l'intérêt de la quantification des CEC dans la prise en charge thérapeutique des enfants souffrant d'HTAP secondaire à une cardiopathie congénitale, dont les formes irréversibles présentaient des taux élevés de CEC. Nous avons ainsi défini un nouveau marqueur non invasif à utilité diagnostique et pronostique.

Les PEC sont des cellules rares dans le sang circulant, difficiles à expandre, et dont les essais de mobilisation médullaire se sont révélés insuffisants. L'hypothèse récente d'une réserve vasculaire des progéniteurs endothéliaux nous a conduits à étudier l'effet d'un processus d'ischémie locale sur la mobilisation de ces cellules chez des volontaires sains. Deux groupes d'âge ont été inclus afin d'évaluer l'impact du vieillissement sur la méthode de mobilisation étudiée. Malgré un effet de cette ischémie sur la dilatation endothéliale cette méthode n'a pas permis de mobiliser significativement les PEC issus de la paroi endothéliale, quel que soit l'âge des sujets. A l'inverse, l'hypoxie a eu un effet délétère sur les capacités angiogènes des ECFC.

**Mots-clés :** cellules endothéliales circulantes, progéniteurs endothéliaux circulants, hypertension artérielle pulmonaire, mobilisation, thérapie cellulaire.

# TABLE DES MATIERES

<b>TABLE DES MATIERES .....</b>	<b>4</b>
<b>LISTE DES FIGURES.....</b>	<b>7</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX .....</b>	<b>8</b>
<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>9</b>
<b>I) L'endothélium.....</b>	<b>9</b>
I.1 Structure de la paroi vasculaire .....	9
I.2 Formation des vaisseaux sanguins .....	11
1) Vasculogenèse .....	11
2) Angiogenèse .....	12
3) Artériogenèse.....	13
I.3 Fonctions de l'endothélium .....	13
1) Contrôle du tonus vasculaire .....	13
2) Contrôle de l'hémostase.....	14
3) Contrôle de l'inflammation .....	17
4) Contrôle de la perméabilité vasculaire .....	18
I.4 Dynamisme de l'endothélium .....	19
1) Contrôle par l'épigénétique.....	19
2) Contrôle par le microenvironnement.....	20
I.5 Exploration de la fonction endothéliale .....	21
1) Evaluation de la rigidité artérielle.....	21
2) Evaluation de la réactivité endothéliale.....	25
<b>II) Les marqueurs circulants de lésion/activation endothéliale.....</b>	<b>28</b>
II.1 La lésion endothéliale.....	28
II.2 Les marqueurs solubles plasmatiques .....	31
1) Marqueurs des fonctions hémostatiques de l'endothélium .....	31
2) Marqueurs d'activation endothéliale.....	32
3) Marqueurs des fonctions vasomotrices.....	34
II.3 Les microparticules endothéliales .....	36
1) Origine, identification.....	36
2) Quantification .....	36
3) Activité biologique .....	37
4) Applications cliniques .....	38
II.4 Les cellules endothéliales circulantes .....	39
1) Identification.....	39
2) Quantification .....	40
3) Applications cliniques .....	44
<b>III) Les marqueurs de la réparation endothéliale : les progéniteurs endothéliaux circulants .....</b>	<b>47</b>
III.1 Réparation endothéliale et notion de vasculogenèse post-natale .....	47
1) Preuve de concept.....	47

2) Vasculogenèse post-natale.....	48
<b>III.2 Caractérisation des progéniteurs endothéliaux circulants .....</b>	<b>49</b>
1) Définition.....	49
2) Quantification .....	51
3) Origine des PEC .....	61
<b>III.3 Applications cliniques .....</b>	<b>65</b>
1) PEC et facteurs de risque cardio-vasculaire .....	65
2) PEC et pathologies cardio-vasculaires.....	66
3) PEC et autres pathologies .....	67
4) Conclusion.....	67
<b>III.4 Applications thérapeutiques .....</b>	<b>67</b>
1) Preuve de concept chez l'animal .....	67
2) Développement d'un produit de thérapie cellulaire .....	68
3) Etudes cliniques chez l'homme .....	75
4) Angiogenèse pathologique .....	79
<b>IV) L'hypertension artérielle pulmonaire.....</b>	<b>80</b>
<b>IV.1 Définition et classification .....</b>	<b>80</b>
1) HTAP secondaire aux cardiopathies congénitales.....	82
2) HTP post-embolique.....	83
<b>IV.2 Diagnostic.....</b>	<b>83</b>
<b>IV.3 Physiopathologie .....</b>	<b>84</b>
1) Histologie .....	84
2) Rôle central de la cellule endothéliale dans l'HTAP .....	86
3) Angiogenèse et HTAP .....	91
<b>IV.4 Traitements.....</b>	<b>97</b>
1) Traitement conventionnel .....	97
2) Traitement spécifique de l'HTAP .....	98
<b>V) Le vieillissement endothélial.....</b>	<b>100</b>
<b>V.1 Altérations structurales liées au vieillissement .....</b>	<b>100</b>
1) Modifications structurales .....	101
2) Augmentation de la rigidité artérielle .....	101
<b>V.2 Dysfonction endothéliale.....</b>	<b>102</b>
1) Altération de la réactivité endothéliale .....	103
2) Diminution de la biodisponibilité du NO .....	103
3) Le stress oxydant .....	104
4) La sénescence .....	104
5) La réparation endothéliale .....	106
<b>TRAVAUX.....</b>	<b>112</b>
<b>I) Objectifs du travail.....</b>	<b>112</b>
<b>II) Compartiment endothélial circulant et HTAP .....</b>	<b>113</b>
<b>II.1 Population pédiatrique.....</b>	<b>113</b>
1) Résumé .....	113
2) Article publié .....	114
<b>II.2 CEC et HTAP : adulte .....</b>	<b>115</b>

1) Résumé .....	115
2) Article publié .....	116
II.3 ECFC et tréprostinil .....	117
1) Résumé .....	117
2) Article publié .....	118
<b>III) Développement d'un produit de thérapie cellulaire.....</b>	<b>119</b>
1) Résumé .....	119
2) Article soumis.....	120
<b>Adult blood ECFC isolation .....</b>	<b>125</b>
<b>DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES .....</b>	<b>157</b>
<b>CONCLUSION.....</b>	<b>167</b>
<b>ANNEXES.....</b>	<b>168</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE .....</b>	<b>170</b>

## **LISTE DES FIGURES**

Figure 1 : Structure de la paroi vasculaire.....	10
Figure 2 : Formation de nouveaux vaisseaux par vasculogenèse et angiogenèse.....	12
Figure 3 : Exploration de la rigidité artérielle. ....	22
Figure 4 : Exploration de la réactivité endothéliale par la dilatation dépendante de l'endothélium. ....	27
Figure 5 : Classification des atteintes endothéliales.....	29
Figure 6 : Marqueurs circulants de lésion et régénération endothéliales .....	30
Figure 7 : Méthodes de culture des différentes sous-populations de PEC .....	53
Figure 8 : Voies de différenciation hypothétiques des PEC.....	64
Figure 9 : Localisation des anomalies histologiques apparaissant au cours du développement d'une HTAP. ....	85
Figure 10 : Physiopathologie de l'HTAP .....	87
Figure 11 : Principaux mécanismes à l'origine de la dysfonction endothéliale observée au cours du vieillissement. (Adapté de Toda 2012).....	102



## **LISTE DES TABLEAUX**

Tableau I : Exemples de numération des CEC indiquant la méthode utilisée et les valeurs obtenues dans différentes pathologies.....	46
Tableau II : Caractéristiques des PEC précoces et tardifs.....	50
Tableau III : Exemples de conditions de culture des ECFC .....	54
Tableau IV : Principaux essais cliniques de thérapie cellulaire basés sur l'administration de CMN médullaires dans l'AOMI .....	76
Tableau V : Principaux essais cliniques de thérapie cellulaire chez les patients présentant une pathologie ischémique cardiaque .....	78
Tableau VI : Classification OMS des hypertensions pulmonaires (Dana Point, 2008). .....	81
Tableau VII : Résumé des résultats de l'exploration des cellules progénitrices dans l'HTAP. 95	
Tableau VIII : Résumé des résultats de l'étude des cellules progénitrices dans le vieillissement .....	108

## INTRODUCTION

En raison de sa situation et de ses multiples fonctions, la dysfonction de l'endothélium est un facteur prépondérant dans la pathogenèse des maladies vasculaires. En biologie clinique, l'exploration de la CML est limitée en raison de sa position difficilement accessible à des investigations de routine et au manque de marqueurs spécifiques. La mise en évidence récente de marqueurs endothéliaux circulants permet d'évaluer l'intégrité de l'endothélium, dont le maintien est indispensable pour l'homéostasie vasculaire. Après un rappel sur l'endothélium et son exploration, nous ferons le point sur ces marqueurs. Deux contextes de dysfonction endothéliale seront ensuite abordés : un contexte pathologique qui est l'hypertension pulmonaire, et un contexte physiologique qui est le vieillissement.

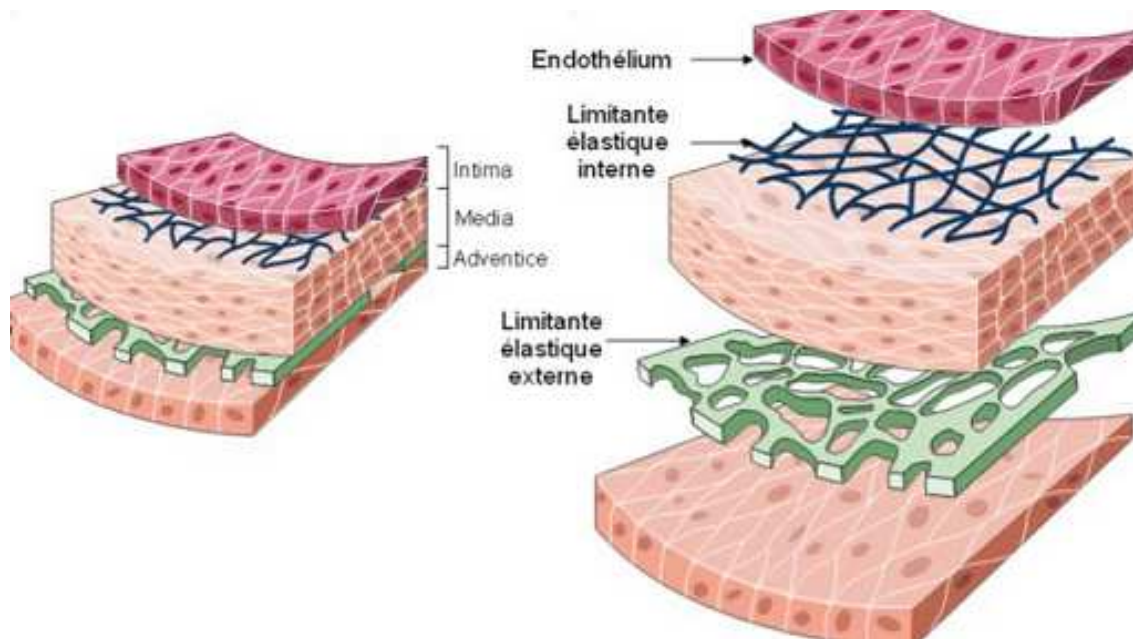
### I) L'endothélium

Longtemps considéré comme une surface inerte, il est maintenant bien démontré que l'endothélium est une structure disséminée active et hétérogène, communiquant avec son environnement et participant à de nombreux processus physiologiques (Cines 1998). En raison de ses multiples fonctions, l'endothélium est impliqué dans de nombreux mécanismes physiologiques et pathologiques et suscite un intérêt grandissant. Son étude a permis d'améliorer la compréhension des mécanismes physiopathologiques vasculaires.

#### I.1 Structure de la paroi vasculaire

La paroi vasculaire est constituée de trois tuniques disposées de manière concentrique de la cavité endoluminale vers la périphérie de l'artère : l'intima, la media et l'adventice (**Figure 1**). L'intima est la couche interne de la paroi artérielle. Elle est principalement constituée d'une monocouche de cellules endothéliales (CE) de 15  $\mu\text{m}$  environ, appelée endothélium, reposant sur une membrane basale. Sur l'ensemble des vaisseaux, de 1 à  $6.10^{13}$  CE, soit 1 kg de cellules recouvrant une surface de 4 000 à 7 000  $\text{m}^2$  forment cet endothélium (Aird 2005). L'intima est séparée de la media par la limitante élastique interne, d'épaisseur 40 à 80  $\mu\text{m}$ , constituée de fibres élastiques. La media, couche moyenne, constitue la couche principale de l'artère. C'est un empilement concentrique d'unités lamellaires formées de cellules musculaires lisses (CML) et d'une matrice conjonctive (élastine, collagène et mucosaccharides). La media est séparée de l'adventice par la limitante élastique externe, constituée d'épaisses lames d'élastine percées de fenestrations, permettant le passage

bidirectionnel de substances et de cellules. L'adventice, tunique externe, est constituée d'un tissu conjonctif basal, de fibroblastes, de cellules adipeuses et de *vasa et nervi vasorum*. L'importance de ces trois tuniques est variable selon le type de vaisseaux, et conditionne leurs fonctions.



**Figure 1 : Structure de la paroi vasculaire**

On distingue trois types d'artères (Tortora and Derrickson 2009). Les artères élastiques ou conductrices sont les grosses artères situées près du cœur. Elles ont une media très développée, riche en fibres élastiques, collagène et fibres musculaires. Ce sont des vaisseaux élastiques qui résistent faiblement à l'écoulement. La paroi de ces artères est suffisamment grosse pour nécessiter son propre système vasculaire, les *vasa vasorum*. Les artères musculaires ou artères distributrices sont des artères moyennes dont la media est plus riche en muscle lisse mais moins en fibres élastiques que les artères conductrices. Ceci leur confère une grande capacité de vasoconstriction et de vasodilatation qui leur permet ainsi de réguler l'écoulement sanguin vers les tissus. Les artérioles sont les plus petites artères, situées dans les tissus avant les capillaires. Celles situées près des artères ont une composition semblable à celles-ci. Alors que pour celles situées près des capillaires, les tuniques se limitent à un anneau de CE entourées de quelques CML. Elles assurent le débit sanguin entre les artères et les capillaires d'un tissu en fonction de l'activité de l'organe concerné. Les capillaires ont un très petit diamètre, se situent autour des cellules dans les tissus entre les artérioles et les veinules. Ils ne sont constitués que d'une seule couche de CE et d'une membrane basale sans

tunique moyenne ni externe. Ils assurent les échanges entre le sang et les cellules, la vitesse d'écoulement dans cette microcirculation étant seulement de 8 mm par seconde. Les sphincters entre artérioles et capillaires répartissent la masse sanguine selon les besoins, si bien qu'à chaque instant, seulement 5 % des capillaires sont irrigués par les artérioles. Les veinules sont des petites veines formées par l'union de plusieurs capillaires. Elles recueillent le sang des capillaires et le déversent dans les veines. Celles qui sont près des capillaires se composent d'endothélium et de quelques CML. Celles proches des veines possèdent une tunique externe semblable à celle des veines. Les veines ont un très grand diamètre et sont constituées des mêmes trois tuniques que les artères mais leur épaisseur relative est différente. Elles contiennent surtout du collagène et peu de fibres musculaires lisses. Elles assurent le retour du sang vers le coeur et constitue un réservoir sanguin.

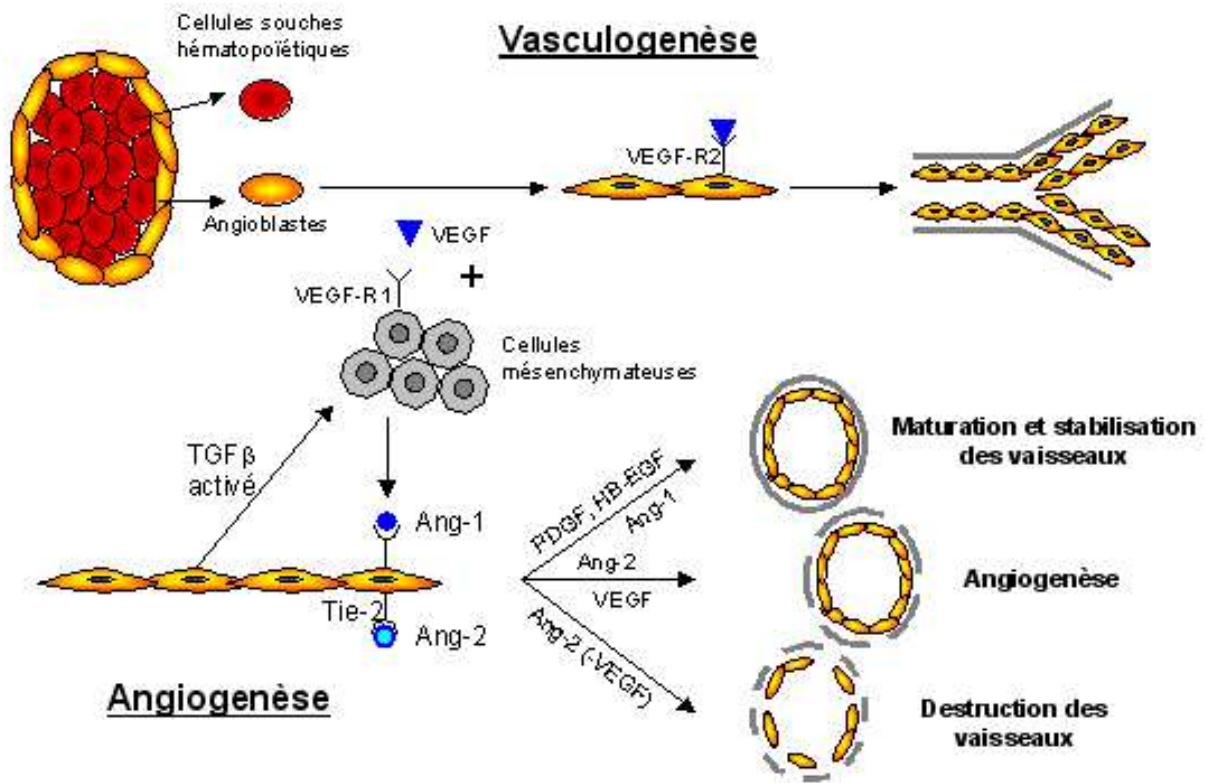
## **I.2 Formation des vaisseaux sanguins**

La formation de nouveaux vaisseaux implique différents mécanismes. La vasculogenèse est la formation des premiers vaisseaux à partir de cellules progénitrices, l'angiogenèse correspond à la croissance des petits vaisseaux formant les capillaires à partir des cellules pré-existantes, et l'artériogenèse permet la croissance des gros vaisseaux de distribution qui nécessite l'entourage de la couche endothéliale par des péricytes ou des CML.

### **1) Vasculogenèse**

L'appareil cardiovasculaire est le premier organe à se développer, dès le 18<sup>ème</sup> jour de la gestation. D'après leur profil moléculaire, les tissus vasculaires et hématopoïétiques au stade embryonnaire semblent avoir une origine commune, l'hémangioblaste (Pelosi 2002). De plus, la présence de cellules souches hématopoïétiques (CSH) dans le plancher ventral de l'aorte dorsale, à l'intérieur de la région AGM (aorte - gonades - mésonéphros), a été démontrée au cours du développement foetal, avant la colonisation du foie foetal par ces cellules, qui a lieu au 6<sup>ème</sup> mois (Garcia-Porrero 1998). Les CSH y apparaissent sous forme de foyers accrochés à l'endothélium sous-jacent. La vasculogenèse commence par la formation d'îlots sanguins dans le sac vitellin primitif, issus de la migration de cellules mésodermes et de leur différenciation en hémangioblastes. La couche externe contient les angioblastes, et la couche interne, les CSH (**Figure 2**). Lors de la vasculogenèse, les angioblastes migrent sous l'influence de facteurs de croissance : *basic fibroblast growth factor* (bFGF) et *vascular endothelial cell growth factor* (VEGF), permettant la fusion des îlots sanguins, leur

réarrangement en structures tubulaires et la formation du premier plexus vasculaire primitif. Ces tubules forment ensuite de larges vaisseaux permettant la circulation sanguine (Risau and Flamme 1995).



**Figure 2 : Formation de nouveaux vaisseaux par vasculogenèse et angiogenèse.**

A- Vasculogenèse. Les angioblastes de la couche externe des îlots sanguins migrent sous l'influence de facteurs de croissance, se multiplient et se différencient pour former localement des structures en tube de cellules endothéliales. B- Angiogenèse. Sous l'action de l'angiopoïétine 1 (Ang-1) sur son récepteur Tie-2, les cellules bourgeonnent. Le recrutement de cellules péri-endothéliales permet de stabiliser le vaisseau. La fixation de l'angiopoïétine 2 (Ang-2) sur Tie-2 favorise le développement de nouveaux vaisseaux. L'absence de facteurs de croissance conduit à la destruction des vaisseaux. Adapté de Cines et al. (Cines 1998)

## 2) Angiogenèse

L'expansion de l'arbre vasculaire à partir de ces vaisseaux sanguins existants correspond à l'angiogenèse. Elle a lieu chez l'embryon lors du développement du système cardiovasculaire, et chez l'adulte après lésion endothéliale ou au cours de la vascularisation tumorale. Les 3 principaux facteurs initiant la migration des CE sont le VEGF, le bFGF et les angiopoïétines. Elle se déroule en trois étapes : libération des CE, migration, stabilisation du vaisseau (Carmeliet and Jain 2011). Sous l'influence des signaux pro-angiogéniques, les

cellules bourgeonnent à partir des extrémités et des parois latérales des vaisseaux préexistants. La fixation de l'angiopoïétine 2 (Ang-2) sur son récepteur Tie-2, en présence du VEGF, conduit au détachement des péricytes, à la dégradation de la matrice extracellulaire (MEC) et la libération de facteurs angiogènes (**Figure 2**) et potentialise les effets du VEGF (Maisonpierre 1997). L'activation du VEGFR-2 à la surface des CE stimule le renouvellement des points focaux d'adhésion, entraîne une vasodilatation via la production de monoxyde d'azote (NO) par la NO synthase endothéliale (eNOS), et favorise la polymérisation de l'actine (Lamallice 2007). La migration des CE, dirigée par une CE appelée "tip cell", et l'étirement des "stalk cell" conduit à la formation d'un nouveau vaisseau dont la membrane est constituée de protéines sériques. Sous l'effet de facteurs tels que le PDGF (platelet-derived growth factor), l'angiopoïétine-1 (Ang-1) ou le TGF- $\beta$  (transforming growth factor  $\beta$ ), les CE retournent à un état quiescent et des cellules péri-vasculaires sont recrutées pour stabiliser le vaisseau. En l'absence de facteur de croissance, il y a destruction des vaisseaux (Suri 1996).

### **3) Artériogenèse**

Elle correspond à la formation des éléments de plus gros calibre et à la différenciation artério-veineuse. Les structures vasculaires sont alors consolidées par les CML et de la MEC.

## **I.3 Fonctions de l'endothélium**

L'hétérogénéité des fonctions endothéliales explique leur implication dans de nombreuses pathologies. L'endothélium assure en effet le contrôle du tonus vasculaire, de la migration transendothéliale des leucocytes régulant ainsi l'inflammation, de la perméabilité vasculaire et de la coagulation. Il a également un rôle anti-oxydant et régule la croissance cellulaire.

### **1) Contrôle du tonus vasculaire**

Les CE sécrètent de nombreux médiateurs influençant l'hémodynamisme vasculaire dans son état physiologique. Elles régulent la pression sanguine et le flux sanguin par libération de molécules vasodilatatrices comme le NO et la prostacycline ou prostaglandine I<sub>2</sub> (PGI<sub>2</sub>), ainsi que des molécules vasoconstrictrices, telles que l'endothéline-1 (ET-1) et le platelet-activating factor (PAF). Seul le NO est synthétisé de manière constitutive. Son taux de production est régulé par de nombreux stimuli exogènes, chimiques ou mécaniques.

Le NO est un radical libre synthétisé lors de l'oxydation de la L-arginine en L-citrulline par la NOS. La eNOS est active de manière constitutive mais de nombreux composés peuvent augmenter son activité : la thrombine, l'adénosine 5'-diphosphate (ADP), la bradykinine, la substance P, les agonistes des récepteurs muscariniques ainsi que les forces de cisaillement. Le NO exerce des fonctions importantes au sein du vaisseau. Il maintient le tonus basal par relaxation des CML. Le NO inhibe aussi l'adhésion des leucocytes à l'endothélium, l'activation plaquettaire (stimule la formation de GMP cyclique), ainsi que la migration et la prolifération des CML. Cet effet lui permet de limiter la prolifération néointimale lors de la réparation vasculaire, en synergie avec la stimulation de la migration et de la prolifération des CE.

L'ET-1 est le plus puissant agent vasoconstricteur. La synthèse de son propeptide est stimulée par l'hypoxie, les forces de cisaillement et l'ischémie. Elle entraîne la contraction des CML après action sur son récepteur ET-A, par augmentation du calcium intracellulaire et activation de la protéine kinase C. Elle stimule aussi la prolifération cellulaire avec un effet à long terme par accumulation du calcium en intracellulaire, que le NO peut réverser. Son action sur le récepteur ET-B, présent sur les CE, est impliquée dans la sécrétion du NO et de la PGI2 (Wilkins 2012).

La PGI2 et le PAF permettent d'affiner la régulation du tonus vasculaire. Ces molécules lipidiques impliquées dans le signalment intercellulaire peuvent être synthétisées rapidement et leur demi-vie est courte. La PGI2 agit par un mécanisme paracrine après sa libération par les CE. Elle permet la relaxation des CML par fixation sur son récepteur IP et augmentation de l'AMPc et inhibe l'agrégation plaquettaire, ainsi que la prolifération des CML. Sa synthèse est induite au niveau des sites de perturbation vasculaire et elle a aussi un rôle dans les réponses inflammatoires locales. Le PAF reste à la surface des CE et permet l'adhésion des leucocytes à la paroi vasculaire, agissant ainsi selon un mode juxtacrine.

## **2) Contrôle de l'hémostase**

La fonction principale de l'endothélium est de faciliter la circulation sanguine en présentant une surface antithrombotique. Sous l'effet de facteurs extrinsèques mécaniques ou chimiques, l'endothélium peut devenir procoagulant.

## 2.1 Contrôle de l'hémostase primaire

Lors d'une lésion vasculaire, il se produit une vasoconstriction réflexe conduisant à une diminution du débit sanguin.

Dans un premier temps, on observe la phase d'adhésion plaquettaire, par liaison aux composés sous-endothéliaux, et en particulier au collagène, soit directement par les glycoprotéines (GP) Ia et VI, soit indirectement par liaison du facteur Willebrand (FVW) au complexe GPIb-IX-V plaquettaire. Le FVW est synthétisé par les CE et les mégacaryocytes. Il est présent dans les plaquettes, le plasma et le sous-endothélium sous des conformations différentes. Ce sont les mutimères de grande taille, présents au niveau du sous-endothélium, qui représentent la conformation permettant la fixation des plaquettes. Quand les forces de cisaillement sont faibles, comme dans les veines par exemple, les plaquettes peuvent aussi s'immobiliser directement par liaison de l'intégrine GPIIbIIIa ( $\alpha_{IIb}\beta_3$ ) au fibrinogène.

Les plaquettes sont alors activées et sécrètent leur contenu granulaire, comme l'ADP et de nombreuses protéines impliquées dans l'angiogenèse, et génèrent du thromboxane  $A_2$  (TXA<sub>2</sub>). C'est la phase sécrétoire. L'ADP provoque l'activation d'autres plaquettes. Le TXA<sub>2</sub> a une action vasoconstrictrice et peut induire la phase sécrétoire et l'agrégation plaquettaire.

Sous l'action de divers agonistes, l'adhésion des plaquettes activées est amplifiée ainsi que le recrutement d'autres plaquettes. La formation du clou plaquettaire permet l'arrêt transitoire du saignement. L'agrégation plaquettaire nécessite la présence de fibrinogène qui assure la constitution de ponts interplaquettaires par liaison à son récepteur la GPIIbIIIa, complexe fonctionnel après modification conformationnelle seulement. L'agrégation plaquettaire devient irréversible après transformation du fibrinogène soluble en fibrine insoluble par la thrombine.

A l'état quiescent, les CE inhibent l'interaction des plaquettes avec leur surface, en partie sous l'effet du NO et de la PGI<sub>2</sub>. Le NO inhibe l'adhésion, l'activation, la sécrétion et l'agrégation plaquettaire et favorise leur désagrégation par un mécanisme dépendant du GMPc. La PGI<sub>2</sub> agit en synergie avec le NO pour inhiber l'activation plaquettaire par blocage du changement conformationnel dépendant du calcium du récepteur au fibrinogène, la GPIIbIIIa, nécessaire à la fixation du fibrinogène sur son récepteur.



## 2.2 Contrôle de la coagulation

C'est le contrôle de la génération de thrombine qui est l'étape autour de laquelle s'équilibre la balance entre les effets anti et procoagulants (Cines 1998).

La thrombine stimule l'activation des plaquettes, de nombreuses enzymes de la coagulation et leurs cofacteurs. Elle stimule également l'effet procoagulant des CE. L'antithrombine se lie aux héparanes sulfates et aux protéoglycanes de la surface endothéliale. Sous l'action de l'héparine, les CE libèrent du TFPI (tissue factor pathway inhibitor), qui se lie au facteur Xa au sein du complexe FT/FVII/Xa et diminue ainsi la génération de thrombine (Broze 1995). L'endothélium exprime aussi la thrombomoduline. Sa liaison à la thrombine est nécessaire à l'activation de la protéine C. La protéine C interagit avec son cofacteur, la protéine S, synthétisée entre autres par les CE, pour exercer son activité anti-coagulante par inactivation des facteurs V et VIII. La CE exprime le récepteur à la protéine C (EPCR), ce qui accélère l'activation de celle-ci. La thrombomoduline diminue également l'activation des plaquettes, des facteurs V, XIII et du fibrinogène par la thrombine et stimule l'activité fibrinolytique des CE. La thrombomoduline inhibe l'activité du facteur Xa et donc la génération de thrombine.

Sous l'action de cytokines inflammatoires, la CE devient procoagulante. L'expression de la thrombomoduline est diminuée et son internalisation accélérée avec en parallèle une augmentation de l'expression du facteur tissulaire (FT). Cette expression pourrait être liée au dépôt de microparticules d'origine monocyttaire à la surface des CE (van Hinsbergh 2012). C'est la première étape d'acquisition du phénotype procoagulant. Le FT amplifie l'activation du facteur X par le facteur VIIa, activant ainsi la voie extrinsèque de la coagulation qui conduit à la génération de thrombine et la formation de fibrine. L'activité procoagulante du FT est accélérée par l'exposition de phospholipides anioniques à la surface des CE, qui a lieu lors de l'apoptose des cellules. *In vitro*, la synthèse du FT peut être induite par la thrombine, des endotoxines, différentes cytokines, les forces de cisaillement, l'hypoxie, des lipoprotéines oxydées et encore d'autres facteurs. *In vivo*, l'expression du FT est induite rapidement après une lésion vasculaire et du FT est retrouvé au niveau des plaques d'athérosclérose et des vaisseaux dérivés des tumeurs. Le FT participerait également à la régulation de l'angiogenèse. L'expression du récepteur à la thrombine PAR-1 (protease-activated receptor-1) permet à la thrombine d'induire de nombreux changements dans l'expression de molécules prothrombotiques et antithrombotiques, telles que le FT, le PAI-1 (plasminogen activator inhibitor 1), le NO, le PAF, l'ET-1 et la PGI<sub>2</sub>, lors de la culture des CE. La thrombine a

également un effet mitogénique sur les CE, les fibroblastes et les CML. La CE exprime également des récepteurs pour la fibrine et ses produits de dégradation, dont la fixation stimule l'adhésion, la diffusion, la prolifération et la migration des CE, l'adhésion leucocytaire, et inhibe la synthèse de la PGI<sub>2</sub>.

### **2.3 Contrôle de la fibrinolyse**

Les CE peuvent selon les situations développer une activité pro- ou anti-fibrinolytique (Cines 1998). L'endothélium semblerait profibrinolytique au repos par sécrétion de l'activateur tissulaire du plasminogène, le t-PA, seulement par une sous-population de CE de la microcirculation. Le t-PA est un puissant activateur de fibrinolyse, permettant la transformation de plasminogène en plasmine qui dégrade la fibrine. La CE exprime elle-même des sites pouvant lier le t-PA qui favorisent le développement de son activité fibrinolytique, ce qui stimule la prolifération cellulaire.

En conditions d'activation par divers stimuli, tels que la thrombine, les endotoxines, certaines cytokines inflammatoires et des LDL (low-density lipoprotein) oxydées entre autres, les CE peuvent sécréter le principal inhibiteur du t-PA, le PAI-1 (plasminogen activator inhibitor 1) dans le sang circulant qui se fixe également dans la MEC et neutralise l'activité fibrinolytique du t-PA et de l'u-PA (urokinase) produite par d'autres cellules que la CE. Par ailleurs, la liaison de la thrombine à la thrombomoduline de la surface endothéliale accélère sa capacité d'activation du TAFI (thrombin activable fibrinolysis inhibitor) qui clive des extrémités lysines du réseau de fibrine, empêchant l'activation du plasminogène en plasmine et retardant la fibrinolyse.

### **3) Contrôle de l'inflammation**

Lors de son activation, l'endothélium peut présenter des antigènes aux lymphocytes après induction de l'expression des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II et il permet le recrutement de cellules inflammatoires (Cines 1998). L'interaction des cellules avec les vaisseaux se fait en quatre étapes : attachement des cellules par une liaison réversible, permettant le roulement des cellules à la surface de l'endothélium, puis activation des cellules adhérentes avec une adhésion qui devient irréversible et résistante au flux, et enfin diapédèse des leucocytes entre les CE pour exercer leurs fonctions dans tissu sous-jacent.

Contrairement aux plaquettes qui se lient au niveau du sous-endothélium des artères soumises à de fortes forces de cisaillement, les leucocytes s'attachent aux CE là où les forces sont faibles, soit dans les veinules post-capillaires. La phase d'attachement des leucocytes se fait par des interactions de la L-sélectine et du PSGL-1 (P-sélectine glycoprotéine ligand) avec des sélectines exprimées à la surface des CE activées : la E et la P sélectines, l'expression de la E-sélectine étant inductible (Cines 1998). Ces molécules peuvent ainsi initier les réponses inflammatoires et immunitaires par adhésion des leucocytes, ainsi que les réponses hémostatiques par liaison aux plaquettes activées. La fixation des ligands leucocytaires à leurs récepteurs endothéliaux, ainsi que les contacts avec les chémokines et cytokines présentes localement à la surface de l'endothélium sont possibles grâce à la faible vitesse de roulement des cellules et conduisent à l'activation des leucocytes. Les intégrines  $\beta 2$  peuvent alors se lier à leurs ligands ICAM-1 et ICAM-2 (Intercellular Adhesion Molecule) et VCAM-1 (Vascular Cell Adhesion Molecule) exprimés sur la surface endothéliale, aboutissant à une adhésion de haute affinité. Les CE synthétisent des chémokines et expriment des molécules comme PECAM-1 (Platelet/Endothelial Cell Adhesion Molecule) permettant la transmigration de leucocytes. Le passage de protéines plasmatiques permet de former une matrice provisoire dans les tissus lors de l'extravasation des leucocytes (Cines 1998). La production concomitante de vasodilatateurs augmente l'acheminement des leucocytes dans les tissus.

#### **4) Contrôle de la perméabilité vasculaire**

L'endothélium forme la barrière la plus importante pour la régulation du passage des macromolécules et la circulation des cellules du sang aux tissus. Ce sont les jonctions inter-endothéliales qui contrôlent la perméabilité cellulaire avec une régulation très fine de l'ouverture et de la fermeture de ces contacts. Elles contrôlent également la croissance cellulaire et la synthèse protéique par transmission de signaux intracellulaires. Ces structures complexes sont constituées de molécules d'adhésion transmembranaires liées à un groupe de protéines cytoplasmiques et au cytosquelette. Trois types principaux de jonctions endothéliales sont décrits selon les territoires vasculaires. Les jonctions serrées ou tight junctions ou zonula occludens sont très présentes dans les endothéliums où le contrôle des échanges entre le sang et les tissus doit être strict comme le cerveau ou les artères de gros calibre (Lampugnani and Dejana 1997). Les jonctions adhérentes ou adjacent junctions ou macula adherens est un complexe très dynamique. Leur présence est ubiquitaire le long de l'arbre vasculaire et essentielle à l'organisation initiale de la monocouche de l'endothélium.

Elles ont un rôle majeur dans l'adhérence, la communication cellulaire et la perméabilité, limitent la migration des cellules et participent à l'inhibition de contact de la croissance cellulaire (Dejana 1995). Les jonctions communicantes ou gap junctions forment un endothélium dit discontinu. Elles sont essentielles pour les échanges inter-cellulaires et prédominent dans les organes où ont lieu beaucoup d'échanges comme le rein ou les glandes endocrines.

A l'état quiescent, l'endothélium assure la fluidité sanguine en exerçant des propriétés anticoagulantes, antiadhésives et vasodilatatrices par l'expression de certaines molécules, ainsi que la synthèse et la sécrétion de nombreux facteurs (Figure 4). Au cours d'agressions multifactorielles, on dit que l'endothélium activé devient procoagulant, vasoconstricteur et favorise l'adhésion des leucocytes et leur migration vers les sites inflammatoires, sur la base des études en culture cellulaire qui ont montré un phénotype d'activation universel. Cependant, la réponse des CE à une activation *in vivo* correspond en fait à un spectre de réponses, qui sera spécifique de la cellule et du signal reçu.

#### **I.4 Dynamisme de l'endothélium**

Deux facteurs principaux sont impliqués dans la régulation des fonctions endothéliales : le microenvironnement et la génétique ou épigénétique. Ainsi, l'endothélium est un système dynamique qui régule ses fonctions selon les signaux qu'il reçoit et dont la réponse à un même signal varie en fonction de ses propriétés intrinsèques déterminées par leur programmation génétique. En retour, l'endothélium exerce un contrôle sur l'environnement. Le phénotype des CE varie donc dans le temps et dans l'espace en fonction des signaux venant du milieu extracellulaire et des cellules adjacentes (Aird 2003). Un endothélium activé n'est pas synonyme de dysfonctionnel, bien que le phénotype cellulaire puisse être le même. Le terme dysfonctionnel correspond à une réponse endothéliale non adaptée et donc néfaste pour l'individu, qu'elle soit locale ou systémique.

##### **1) Contrôle par l'épigénétique**

L'information épigénétique est liée à des méthylations de l'ADN, des modifications des histones et des remodelages de la chromatine. Ces changements ont lieu habituellement pendant le développement embryonnaire, sont transmis aux cellules filles pendant la phase S

de la mitose et ne nécessite pas de signaux d'initiation. Ces modifications sont réversibles et très dynamiques. La programmation épigénétique joue un rôle clé dans la détermination des propriétés spécifiques de site lors du développement embryonnaire, notamment dans la spécialisation des tubes endothéliaux en artères ou en veines. En effet, certaines molécules spécifiques de chacun des sites sont exprimées avant même la formation de l'appareil circulatoire lors du développement embryonnaire (Aird 2003). Des différences notables entre les transcriptomes des artères et des veines, ainsi que ceux des cellules de la microcirculation et des autres ont été décrites par Chi et al (Chi 2003). Ces modifications épigénétiques sont certainement aussi des conséquences de phénomènes post-nataux comme la maladie et le vieillissement (Aird 2006), et pourraient être utilisés en thérapeutique.

L'hétérogénéité de la CE liée à l'épigénétique lui permet d'adapter ses fonctions à chaque territoire vasculaire (artères, veines ou capillaires) (Aird 2003), sur le même principe que la constitution de la paroi vasculaire. L'hétérogénéité s'exprime alors au niveau structural par des différences de morphologie et de type de jonctions. Sur un plan phénotypique, les CE présentent des molécules de surface spécifiques de leur localisation (Aird 2003), pouvant servir à déterminer leur origine lors de leur exploration. L'endothélium exerce de multiples fonctions, mais elles ne seront pas toutes assurées avec la même importance entre les organes et au sein d'un même organe. Par exemple, la fonction principale de l'endothélium des artérioles est la régulation du tonus vasculaire, avec une expression plus importante de la eNOS. L'endothélium des veinules post-capillaires régule principalement le trafic leucocytaire (Aird 2003).

## **2) Contrôle par le microenvironnement**

De nombreux facteurs exogènes sont responsables de la régulation environnementale de la fonction endothéliale. Cela comprend les forces de cisaillement, l'hypoxie, les facteurs de croissance solubles et inhibiteurs, les cytokines, les lipides et les protéines plasmatiques ainsi que le contact avec les cellules circulantes, les cellules de la base tissulaire et avec la MEC (Cines 1998). Le degré de changement phénotypique est remarquable quand les cellules sont retirées de leur tissu natif et exposées à un autre environnement *in vitro*. Le phénomène de transdifférenciation illustre bien cela. La culture de CE aortiques sur une MEC dérivée du poumon induit l'expression de Lu-ECAM-1 (lung-specific endothelial cell adhesion molecule) (Zhu 1991), alors que ces cellules développent des jonctions fenêtrées quand elles sont cultivées sur une matrice dérivée de cellules MDCK (Madin-Darby canine kidney) (Milici

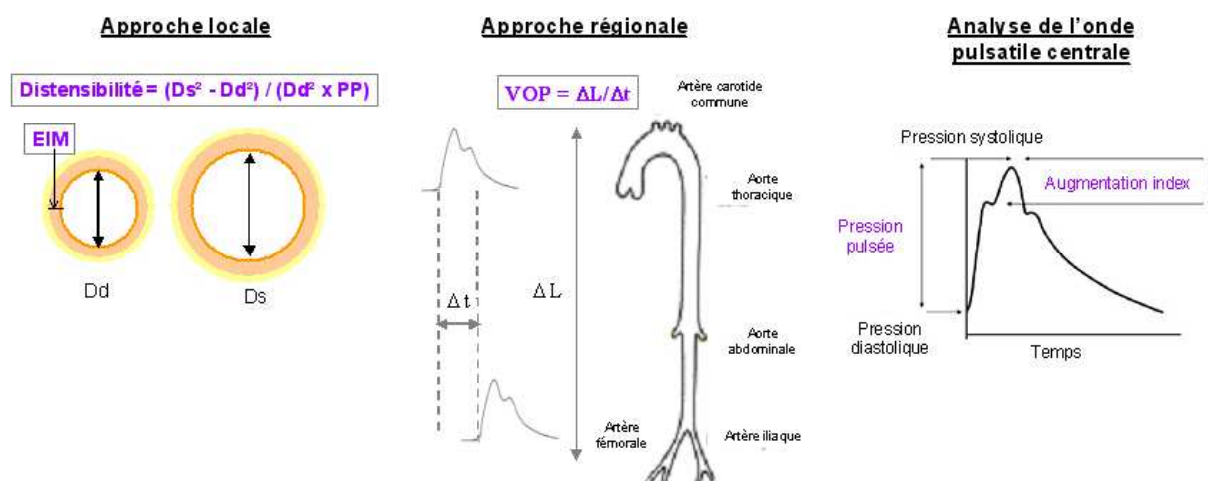
1985). De plus, les effets de la culture cellulaire, conduisant soit à l'activation des cellules soit à l'altération de leur phénotype endothélial montre l'instabilité du phénotype constitutif de la CE et son aptitude à changer rapidement lors de modifications de l'environnement extracellulaire (Cines 1998).

## **I.5 Exploration de la fonction endothéliale**

L'exploration de la fonction endothéliale est importante pour la compréhension des mécanismes physiopathologiques et comme indicateur de l'évolution, voire du pronostic des pathologies impliquant une dysfonction endothéliale. Le caractère difficilement accessible de l'endothélium a motivé le développement de méthodes non invasives d'exploration du vaisseau, pouvant être utilisées chez différentes populations (enfants, individus sains). Les modalités d'exploration de l'endothélium vasculaire consistent donc actuellement à évaluer directement la fonctionnalité de l'endothélium par mesure de la rigidité artérielle et de la réactivité endothéliale, et à doser des biomarqueurs circulants dérivant de l'endothélium reflétant soit une agression/une activation comme les marqueurs solubles plasmatiques, les cellules endothéliales et les microparticules endothéliales, soit la réparation endothéliale comme les progéniteurs endothéliaux circulants. Ces biomarqueurs circulants seront abordés indépendamment dans les chapitres II et III.

### **1) Evaluation de la rigidité artérielle**

L'augmentation de la rigidité artérielle est un signe de dysfonction endothéliale, témoin du remodelage structural de la paroi artérielle. L'évaluation non invasive de la rigidité artérielle peut être réalisée par la mesure de paramètres fortement liés à la rigidité de la paroi. La mesure des caractéristiques géométriques et de la pression sanguine constitue l'approche locale, c'est à dire centrée sur un segment artériel particulier. L'étude de la vitesse de l'onde pulsatile (VOP), qui dépend de l'élasticité des artères constitue l'approche régionale, réalisée entre deux points de l'arbre artériel. L'étude de la forme de l'onde pulsatile centrale est une approche supplémentaire permettant d'aborder le réfléchissement de l'onde. Ces approches sont présentées dans la **figure 3**.



**Figure 3 : Exploration de la rigidité artérielle.**

Ds : diamètre systolique, Dd : diamètre diastolique, PP: pression pulsée

L'anisotropie des propriétés artérielles est importante, les artères ont des propriétés visco-élastiques non linéaires et il existe de puissants mécanismes d'adaptation. Il est donc impossible d'extrapoler les propriétés d'un segment artériel à l'ensemble de l'arbre.

### 1.1 Approche locale

Elle permet de déterminer l'épaisseur intima-media (EIM) et plusieurs paramètres dépendants des caractéristiques géométriques de l'artère telles que la compliance artérielle (changement absolu de diamètre ou de volume avec la pression) et la distensibilité artérielle (changement relatif du diamètre avec la pression) qui dépendent des mesures du diamètre artériel et de la pression sanguine (**figure 3**) (Laurent 2006). Elle nécessite une expertise technique de haut niveau et plus de temps que la détermination de la VOP. Elle n'est donc pas utilisée dans les études épidémiologiques mais réservée aux explorations physiopathologiques, pharmacologiques et thérapeutiques.

Les ultrasons représentent le seul outil permettant de déterminer de manière non invasive les propriétés élastiques de la paroi vasculaire. Les outils d'echotracking ont été développés pour mesurer de manière très précise le diamètre de fin de diastole et le changement de diamètre entre la diastole et la systole. La plupart de ces paramètres nécessitent la mesure de la pression sanguine. Les investigations de géométrie artérielles peuvent être réalisées sur toutes les artères superficielles, notamment la carotide, l'artère fémorale et les artères brachiales.

## 1.2 Approche régionale

La vitesse de l'onde de pouls carotido-fémorale (VOP) est considérée comme la référence pour la détermination de la rigidité artérielle et est l'approche la plus employée à l'heure actuelle. Elle est calculée en rapportant la longueur entre les deux sites de mesure au différentiel de temps entre le début de deux ondes consécutives (Figure 6) (Laurent 2006). Une augmentation de la VOP est généralement reliée à des altérations structurales de la media, telles qu'une augmentation du ratio collagène-élastine, des cassures des fibres d'élastine et de la calcification (Lakatta and Levy 2003). C'est la mesure non invasive la plus simple, robuste et reproductible pour déterminer la rigidité artérielle.

Les ondes pulsátiles peuvent être mesurées par des capteurs de pression comme le Complior System® qui enregistre les ondes de manière simultanée sur différents sites. Il a été utilisé dans la plupart des études épidémiologiques ayant démontré la valeur prédictive de la VOP pour les événements cardiovasculaires (Laurent 2006). Le système SphygmoCor® combine l'utilisation de la tonométrie par aplanissement de haute fidélité qui enregistre les ondes de manière séquentielle aux différents sites, et l'électrocardiogramme, duquel est déduit le délai entre deux ondes (Boutouyrie 2008). Les méthodes de mesure de la distance entre les deux sites peuvent varier, il faut donc être vigilant lorsque des comparaisons sont faites entre plusieurs populations ou lors de méta-analyses. La nécessité de l'évaluation de la distance entre les deux sites de mesure est une limite pour la précision de la technique.

## 1.3 Analyse de l'onde pulsatile centrale

La forme de l'onde pulsatile centrale apporte des informations importantes concernant la rigidité des grosses artères et l'intensité du réfléchissement de l'onde dans le système artériel. Lorsque l'onde se propage le long de l'aorte, il y a génération d'ondes rétrogrades retournant au cœur. En fonction de la position des points de réfléchissement et de la vitesse de l'onde au départ, l'onde réfléchie arrivera à différents moments du cycle cardiaque. Dans les vaisseaux élastiques, la VOP est faible et la distance à parcourir entre les points de réfléchissement et le cœur est longue, ainsi l'onde réfléchie arrive au niveau de la crosse aortique au moment de la diastole, et donc après la phase d'éjection du sang, ce qui ne modifie pas la pression artérielle systolique. Dans le cas d'artères plus rigides ou d'une pression plus élevée, la VOP est plus importante et l'onde réfléchie, arrivant plus tôt, augmente la pression systolique (**Figure 3**).



Le phénomène de réfléchissement de l'onde peut être quantifié grâce à l'index d'augmentation (AIx, augmentation index) qui est la différence de pression entre les deux pics observés à la systole, rapportée à la pression pulsatile (**Figure 3**). La pression pulsée (tension artérielle différentielle), bien que moins précise pour refléter la rigidité artérielle, convient bien aux études sur des grandes populations. Son augmentation avec l'âge ou d'autres conditions est principalement due à une augmentation de la rigidité artérielle et de la pression de l'onde réfléchie depuis la périphérie (Vlachopoulos 2006). Contrairement à la VOP qui représente directement la rigidité artérielle, les pressions centrales et l'AIx ne sont que des indicateurs indirects de cette rigidité et sont plus sensibles aux modifications des ondes de réflexion, du rythme cardiaque et de l'éjection ventriculaire que la VOP.

### 1.4 Applications cliniques

En dehors du vieillissement, des conditions physiologiques comme le faible poids de naissance ou le manque d'activité physique, un contexte génétique tel qu'une histoire familiale de diabète ou d'hypertension, des facteurs de risque cardiovasculaires, des maladies cardiovasculaires ou non sont à l'origine d'une augmentation de la rigidité artérielle (Laurent 2006).

Dans un grand nombre d'études prospectives et rétrospectives, il est maintenant bien démontré que la rigidité vasculaire est un marqueur de sévérité des maladies cardiovasculaires et a une valeur prédictive indépendante des événements cardiovasculaires, surtout quand elle est évaluée par la mesure de la VOP carotido-fémorale (Laurent 2006). Elle a été impliquée comme facteur prédictif indépendant de mortalité cardiovasculaire chez des individus à haut risque (Blacher 1998). Sa valeur prédictive de maladie coronarienne est indépendante du score de risque de Framingham. Ceci peut s'expliquer par le fait que la rigidité artérielle est une conséquence de l'effet à long terme des facteurs de risque sur la paroi vasculaire, contrairement à certains paramètres mesurés classiquement dont la valeur fluctue rapidement. Les données sont moins cohérentes concernant la rigidité artérielle mesurée sur d'autres sites artériels que l'aorte. La pression pulsatile et l'index d'augmentation centraux sont tous deux des facteurs prédictifs de la mortalité chez les patients souffrant d'insuffisance rénale terminale (London 2001) et des événements cardiovasculaires chez les patients avec une hypertension artérielle (Laurent 2006; Williams 2006). L'EIM de la carotide mesurée par les ultrasons représente un marqueur d'athérosclérose structurale. Une augmentation est associée

à la présence de facteurs de risque cardiovasculaires (Raitakari 2003) et à la sévérité de l'athérosclérose coronarienne (Burke 1995).

La rigidité artérielle est à présent incluse dans les recommandations de l'European Society of Hypertension qui sont les suivantes (Laurent 2006) : l'intérêt clinique et la facilité à réaliser la mesure de la vélocité de l'onde de pouls carotido-fémorale en font la méthode de référence pour mesurer la rigidité artérielle. De par son apport d'informations sur les ondes réfléchies, l'association de l'analyse de l'onde pulsatile centrale à la mesure de la VOP permet d'optimiser les analyses. L'évaluation locale de la rigidité artérielle, qui est une mesure directe ne faisant intervenir aucun modèle théorique mais qui demande des compétences techniques supérieures, est réservée aux analyses mécanistiques de pathophysiologie, pharmacologie et thérapeutique.

## **2) Evaluation de la réactivité endothéliale**

La fonction endothéliale est souvent évaluée cliniquement par la mesure du changement de flux sanguin ou du diamètre artériel en réponse à une stimulation de l'endothélium, qui sont au moins en partie des reflets de la biodisponibilité du NO. Plusieurs méthodologies sont utilisées au niveau des artères périphériques, telles que la pléthysmographie après occlusion veineuse et la dilatation dépendante de l'endothélium médiée par le flux (FMD ou flow-mediated dilatation). La première consiste à évaluer le flux sanguin par mesure du changement de volume d'un tissu, suite à une occlusion du retour veineux par un brassard, sans bloquer l'influx artériel (Lekakis 2011). Un cathéter est posé afin de pouvoir injecter des produits stimulant la vasodilatation comme l'Acétylcholine, ou bloquant comme des inhibiteurs de NO. La pléthysmographie est très reproductible et ne présente pas d'effet systémique mais sa nature invasive limite son application en pratique courante. La FMD a été décrite pour la première fois par l'équipe de Celermajer en 1992 (Celermajer 1992). Elle permet la mesure de la dilatation de l'artère brachiale en réponse au flux par un système à ultrasons. Fiable et non invasive, elle est bien corrélée avec la fonction endothéliale coronarienne mesurée par des méthodes invasives. Seuls les détails de cette technique sont présentés dans cette partie.

### **2.1 Principe de la FMD**

Le principe consiste à créer une zone d'ischémie dans le tissu en position distale de l'artère étudiée, en gonflant un brassard de tension au niveau de l'avant-bras, au-dessus de la

pression artérielle systolique afin de bloquer l'influx artériel pendant un temps standardisé (Harris 2010). L'accumulation de produits métaboliques issus de la respiration cellulaire provoque une augmentation de la conductance des vaisseaux et donc un phénomène d'hyperhémie à la levée de l'occlusion. La plupart des vaisseaux répondent à une augmentation des contraintes de cisaillement par une dilatation. Ce phénomène est principalement lié à une libération de NO par les CE artérielles (Joannides 1995). Cependant le type et la taille du vaisseau peut influencer la contribution du NO à cette vasodilatation induite, de même que les caractéristiques du flux sanguin qui stimule la dilatation (Mullen 2001).

## **2.2 Méthodologie**

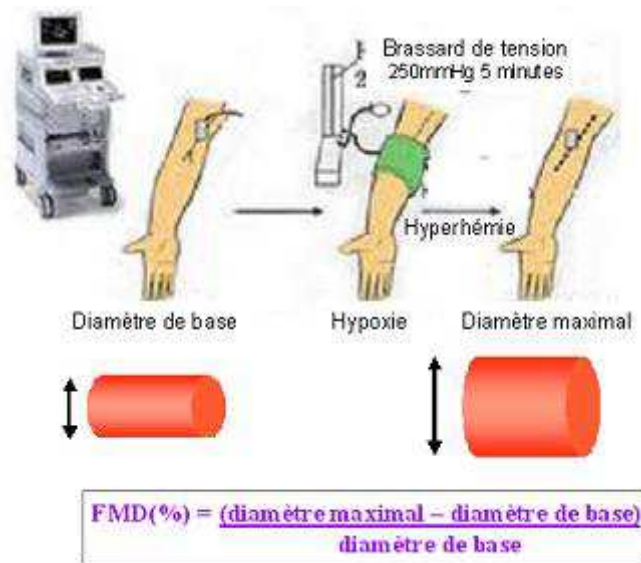
La méthodologie est simple et non invasive. Un équipement approprié et un haut niveau de compétence sont cependant nécessaires. Plusieurs recommandations ont été proposées afin de standardiser sa pratique (Corretti 2002; Deanfield 2005; Pyke and Tschakovsky 2005; Harris 2010).

### Préparation du sujet :

Les sujets doivent être à jeun, sans traitement et au repos depuis au moins 20 minutes. La mesure de la FMD doit être réalisée dans une pièce calme à température contrôlée afin de mesurer le diamètre de base réel. Si plusieurs mesures doivent être effectuées, il faut respecter un délai de 30 minutes entre chaque mesure. Les mesures de FMD ont une variation diurne (Harris 2010), il faut donc tenir compte également de l'heure de réalisation du test surtout s'il doit être répété.

### Réalisation de la technique :

La technique consiste à gonfler un brassard de tension, placé à 1 à 2 cm au-dessous de la fosse antecubitale ou au-dessus, à une pression supérieure à la pression artérielle systolique (200 à 250 mmHg) afin de bloquer l'influx artériel pendant un temps déterminé, le plus souvent 5 minutes (Figure 4) (Lekakis 2011). Le retrait du brassard entraîne une hyperhémie réactive, qui peut être mesurée par doppler. Une sonde échographique est fixée au niveau du bras afin de pouvoir mesurer le changement de diamètre de l'artère brachiale entre l'état de repos et l'hyperhémie réactive.



**Figure 4 : Exploration de la réactivité endothéliale par la dilatation dépendante de l'endothélium.**

#### Analyse des résultats :

La fonction endothéliale, définie par la réponse au flux du vaisseau (FMD) est généralement estimée par le pourcentage d'augmentation du diamètre artériel entre les conditions de base et le diamètre maximum mesuré pendant la phase d'hyperhémie.

La diminution de la relaxation dépendante de l'endothélium varie sur l'ensemble du système vasculaire, les grosses artères comme l'aorte étant les plus affectées (Barton 1997). La contribution des facteurs endothéliaux aux réponses vasodilatatrices diffère en effet entre les sites vasculaires, comme le ratio CE-CML (Barton 1997). L'hétérogénéité du degré d'atteinte de la fonction endothéliale selon le site vasculaire impose la prudence quand on rapporte la fonction vasculaire régionale à la santé cardiovasculaire de l'ensemble du corps.

### **2.3 Applications cliniques**

La dysfonction endothéliale est un évènement précoce de l'athérosclérose qui précède les modifications structurales de la paroi vasculaire. Une altération de la FMD a été observée en réponse à différents facteurs de risque cardiovasculaire dès la première décennie d'âge, et de manière proportionnelle au nombre de facteurs de risque (Celermajer 1994). Une FMD "altérée" est reliée à la prévalence et à l'étendue de l'athérosclérose coronarienne (Neunteufl 1997) et est prédictive d'évènements cardiovasculaires (Gokce 2002). Une fonction endothéliale préservée semble protectrice face au développement d'évènements

cardiovasculaires chez les sujets ayant une maladie vasculaire athéroscléreuse (Gokce 2002). Une étude réalisée chez plus de 2000 sujets sains entre 1980 et 2001 a montré une relation inverse entre la réponse de dilatation au flux et l'EIM, qui démontre bien le lien entre la dysfonction endothéliale et les modifications structurales de la paroi vasculaire (Juonala 2004). Cela met aussi en évidence l'intérêt de mesurer la fonction endothéliale systémique, bon reflet de la susceptibilité des artères à développer de l'athérosclérose suite à une exposition aux facteurs de risque cardiovasculaire, en parallèle de la simple évaluation de la présence des facteurs conventionnels et de la mesure de l'EIM.

La FMD varie rapidement et peut être restaurée par des modifications bénéfiques du mode de vie touchant l'alimentation ou l'exercice (Woo 2004) et par les traitements médicaux comme l'administration de statines, permettant alors d'évaluer l'efficacité d'un traitement. L'amélioration de la vasodilatation médiée par le flux suite à un traitement est associée à une diminution du risque d'évènements cardiovasculaires (Modena 2002).

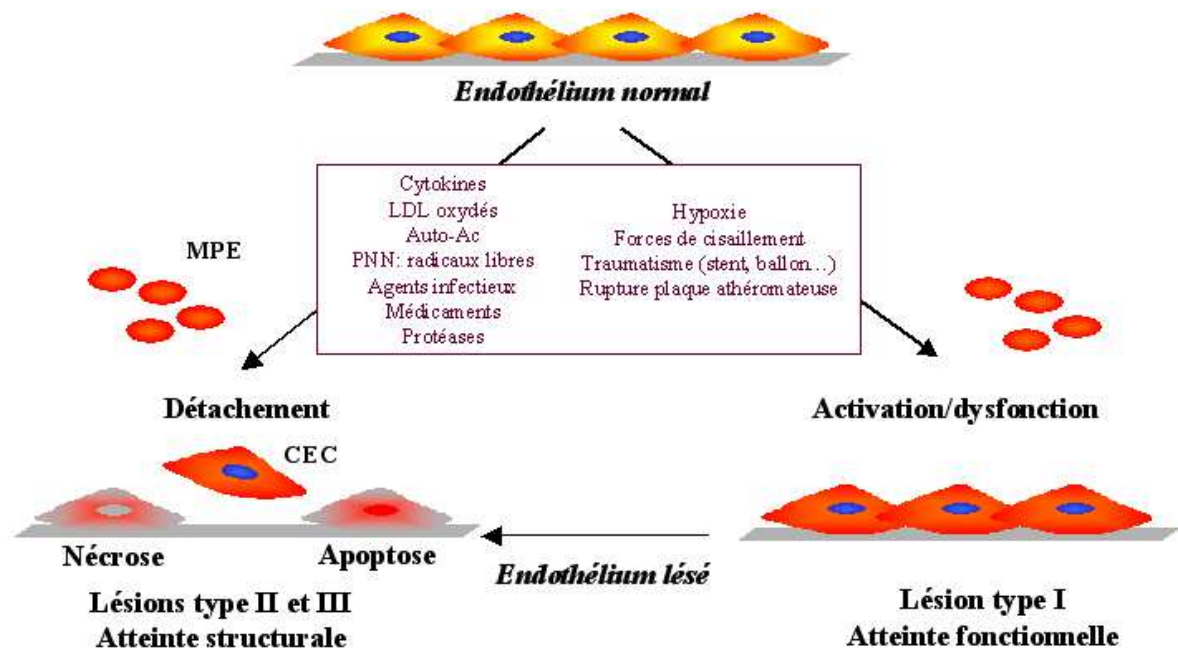
## **II) Les marqueurs circulants de lésion/activation endothéliale**

### **II.1 La lésion endothéliale**

Quelle que soit la taille des vaisseaux, la vitesse de renouvellement de l'endothélium est extrêmement lente, avec un taux basal journalier de réplication de 0,1% (Piccin 2007). En moyenne, 99 % des CE sont quiescentes (Mutin 1999; Ingram 2005). Une atteinte de l'endothélium, qu'elle soit d'origine infectieuse, métabolique, inflammatoire ou immunologique, déclenche une cascade de réactions visant, au départ, à maintenir son intégrité. La CML acquiert alors un phénotype activé physiologique. La persistance de l'agression ou le débordement des mécanismes de contrôle sont à l'origine d'une stimulation chronique conduisant alors à un dysfonctionnement, voire à des lésions irréversibles de la paroi. L'état d'activation de la CML devient alors pathologique.

Ces altérations peuvent se manifester de manière très diversifiée allant de la libération de substances dans les quelques minutes suivant la stimulation, à la mise en place de processus plus complexes incluant des synthèses protéiques et des interactions cellulaires, ou par de véritables lésions de la paroi avec rupture de la continuité de la monocouche endothéliale. Ces atteintes sont classées en trois types, de sévérité croissante (Fuster 1992) (**Figure 5**):

- type I : altérations fonctionnelles non desquamantes des CE
- type II : altérations structurales avec lésions intimaes sans atteinte de la LEI
- type III : altérations structurales dénudantes touchant à des degrés variables les différentes tuniques de la paroi vasculaire (intima et media).

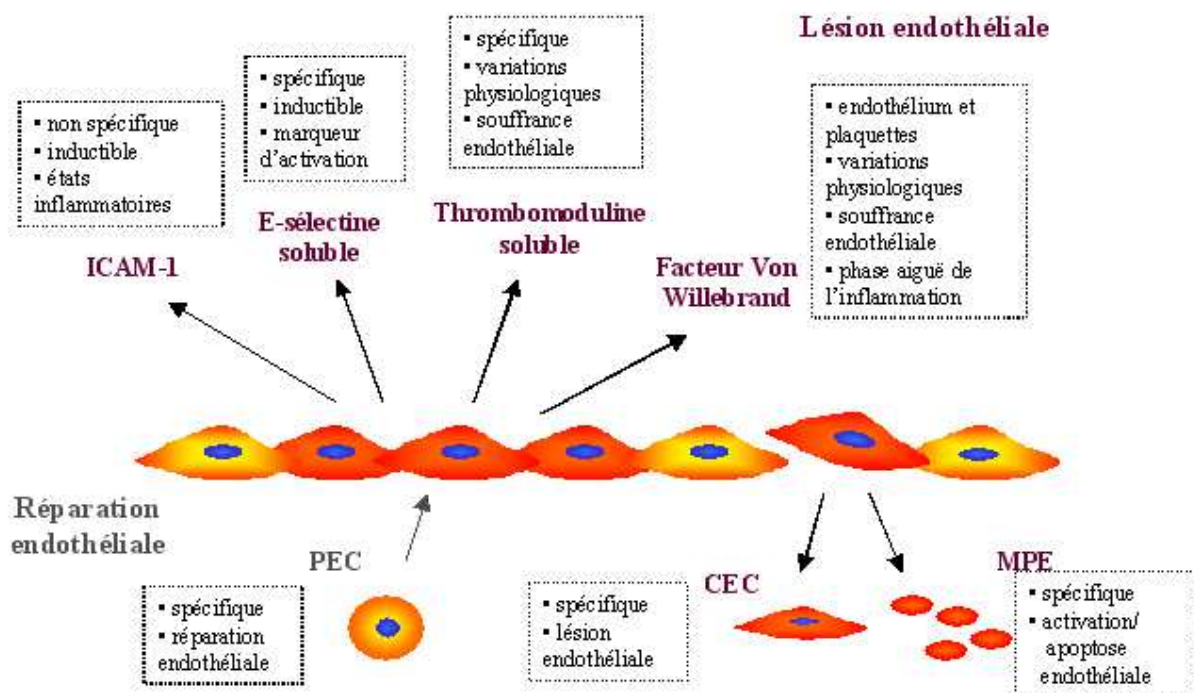


**Figure 5 : Classification des atteintes endothéliales**

Les mécanismes à l'origine du détachement des CE sont multiples et non exclusifs. La lésion de type I ou dysfonction endothéliale peut être liée à une activation excessive ou prolongée des CE. C'est le cas dans l'athérosclérose, la vasculopathie de l'allogreffe, l'hypertension, l'hypertension artérielle pulmonaire (HTAP), le sepsis et les syndromes inflammatoires (Sumpio 2002). La rupture de l'intégrité vasculaire (type II et III) peut être le résultat d'une agression mécanique du tissu vasculaire conduisant à des lésions irréversibles. Elle peut aussi être liée à des phénomènes d'apoptose, comme dans l'athérosclérose (Dimmeler and Zeiher 2004), de nécrose ou de perte de continuité du revêtement endothélial avec détachement de cellules vivantes. Le contact avec les cellules voisines et avec la MEC, assuré par la vitronectine, la fibronectine, les cadhérines et les intégrines, est en effet indispensable à la survie des CE (Woywodt 2002). De même, le flux laminaire et les forces de cisaillement inhibent leur apoptose (Woywodt 2002). Ainsi, la rupture de ces conditions par l'action des protéases ou d'une ischémie peut conduire à des lésions endothéliales. Le détachement des cellules vivantes par rupture de la plaque athéromateuse a été envisagé dans les formes aiguës comme l'infarctus du myocarde (Mutin 1999; Makin 2004).

Ces lésions ont en commun de favoriser la constitution d'un environnement prothrombotique. Dans le type I, il y a induction du phénotype procoagulant de la CML. Dans les types II et III, le sous-endothélium thrombogène est mis à nu, conduisant à l'adhésion des cellules hématopoïétiques circulantes et à l'activation de l'hémostase. Ceci explique le rôle majeur de l'altération de l'endothélium dans le déclenchement des pathologies vasculaires.

Face à une agression de l'endothélium, celui-ci acquiert un phénotype activé, conduisant au relargage de marqueurs solubles dans le plasma ainsi qu'au détachement de cellules endothéliales circulantes (CEC) et à la formation de microparticules endothéliales (MPE) (**Figure 6**). L'angiogenèse et la vasculogenèse post-natale assurent la réparation endothéliale par, respectivement, les CE avoisinantes et la mobilisation de progéniteurs endothéliaux circulants. Au total cette triade dynamique "activation/lésion/régénération" a fait évoluer notre vision de la biologie endothéliale. Elle peut être évaluée indirectement par l'étude de ces biomarqueurs circulants.



**Figure 6 : Marqueurs circulants de lésion et régénération endothéliales**

## **II.2 Les marqueurs solubles plasmatiques**

Ces substances représentent des marqueurs qui nous permettent d'évaluer des altérations endothéliales fonctionnelles en relation avec la régulation de l'hémostase, de la réponse inflammatoire et du tonus vasomoteur. Une liste non exhaustive de ces marqueurs est présentée dans cette partie.

### **1) Marqueurs des fonctions hémostatiques de l'endothélium**

#### **Le facteur Willebrand (FVW)**

C'est une protéine de grande taille, multimérique, synthétisée par l'endothélium où elle est stockée dans les corps de Weibel Palade, et par les mégacaryocytes (Sampol and George 1995). Il est également présent dans les granules  $\alpha$  des plaquettes et dans le sous-endothélium. Il permet l'adhésion des plaquettes au sous-endothélium et joue un rôle dans la coagulation en tant que protéine de transport du facteur VIII. Mises à part les variations physiologiques, son dosage par méthode ELISA montre une augmentation dans toutes les atteintes de l'endothélium vasculaire où il apparaît autant comme marqueur de souffrance endothéliale que comme protéine inflammatoire de la phase aiguë (Sampol and George 1995). C'est un bon indicateur de maladie cardiaque ischémique et de l'infarctus du myocarde (Constans and Conri 2006). L'intérêt de son dosage est limité par son manque de spécificité endothéliale.

#### **La thrombomoduline soluble**

La thrombomoduline est exprimée essentiellement de manière constitutive à la surface des CE (Cines 1998). Elle permet l'activation de la protéine C par la thrombine, et a une action anticoagulante. La thrombomoduline soluble a été retrouvée dans des surnageants de CE lésées. Sa concentration, mesurée par une technique ELISA, varie en fonction de l'origine ethnique, du sexe et de l'âge des individus et de l'existence d'une insuffisance rénale ou hépatique (Sampol and George 1995). Dans les maladies cardiovasculaires, son augmentation est corrélée avec la sévérité de la maladie (Constans and Conri 2006). Elle semble plus représenter un marqueur de souffrance endothéliale que d'activation (Sampol and George 1995). Elle serait surtout intéressante dans les maladies artérielles périphériques et le traitement des facteurs de risque de maladie CV (Constans 2006).



## **L'activateur tissulaire du plasminogène et son inhibiteur, le PAI-1**

C'est une sérine protéase essentiellement d'origine endothéliale et de distribution ubiquitaire dans l'organisme. Au niveau plasmatique, le t-PA est présent à l'état de traces et circule sous forme de complexes avec son inhibiteur principal le PAI-1. Il est caractérisé par une demi-vie très courte (de l'ordre de 2 à 9 minutes). Il peut être dosé par des techniques ELISA ou des techniques fonctionnelles photométriques. Les valeurs normales usuelles évaluant les formes libres et complexées de la protéine sont de 5 à 30 ng/ml. Le t-PA est libéré sous l'influence de substances endogènes et pharmacologiques (adrénaline, thrombine, vasopressine, oestrogènes et hypoglycémifiants...). Le PAI-1 est également dosé par ELISA, quelques études ont montré l'intérêt pronostique de son taux au cours du syndrome métabolique (Alessi and Juhan-Vague 2004).

## **2) Marqueurs d'activation endothéliale**

### **La E-sélectine, ICAM-1 et VCAM-1 solubles**

Ces récepteurs d'adhésion sont augmentés en réponse à une stimulation. La E-sélectine est exprimée de manière spécifique à la surface des CE suite à une activation. Elle permet l'adhésion précoce mais encore réversible des leucocytes pour le roulement le long de la paroi vasculaire (Sampol and George 1995). ICAM-1 et VCAM-1 appartiennent à la famille des immunoglobulines. ICAM-1 est un ligand endothélial des intégrines des leucocytes et des plaquettes, responsable de l'adhésion ferme et irréversible des leucocytes à la paroi vasculaire. L'expression de ces deux molécules est augmentée en réponse aux cytokines inflammatoires et aux LDL oxydées. Elles sont aussi exprimées à la surface des CML et des monocytes et ne sont donc pas spécifiques de l'endothélium (Constans and Conri 2006). Les formes solubles de ces molécules proviennent soit de la synthèse puis sécrétion active de formes dépourvues de domaine extramembranaire, soit de leur clivage enzymatique ou de l'élimination des CE endommagés ou activés (Sampol and George 1995). Elles auraient une activité biologique permettant une autorégulation de la réaction inflammatoire. Elles sont dosées par méthode ELISA. C'est la E-sélectine qui semble la plus intéressante dans l'exploration des atteintes endothéliales inflammatoires de par sa spécificité (Sampol and George 1995). Sa concentration serait un reflet de l'atteinte endothéliale ou de son activation (Constans and Conri 2006). Elle est augmentée dans les pathologies coronariennes et dans le diabète (Constans 2006). L'interprétation des concentrations de la forme soluble de la E-sélectine demande cependant de la prudence comme les taux obtenus chez les sujets sains sont très

étendus, et qu'on note un taux plus bas chez les femmes que chez les hommes avant la ménopause (Constans 2006). ICAM-1 soluble serait prédictif du risque d'infarctus du myocarde et de diabète chez les sujets sains (Constans 2006). VCAM-1 soluble est corrélé avec le risque de syndrome coronarien aigu (Constans 2006).

### **Le CD146**

Le CD146 est une glycoprotéine transmembranaire de la CE, également présente de manière diffuse dans le cytoplasme et au niveau des jonctions endothéliales (Bardin 1996). Il est exprimé de manière constitutive sur la majorité des CE quel que soit le site vasculaire mais aussi à la surface des cellules de mélanome, des CML et des cellules dendritiques folliculaires (Bardin 1996). L'absence de cet antigène sur les cellules hématopoïétiques du sang et de la moelle (Bardin 1996) le rend assez spécifique de l'endothélium. Ainsi, il suscite un grand intérêt comme marqueur pour la détection des CEC. Cependant, les progéniteurs endothéliaux (Delorme 2005), les lymphocytes activés (Elshal 2005) et les cellules péri-vasculaires l'expriment également. Le CD146 est impliqué dans le contrôle de l'architecture cellulaire et tissulaire comme le montre son expression lors de la formation de la monocouche endothéliale, son implication dans le contrôle de la perméabilité cellulaire et sa colocalisation avec le cytosquelette d'actine (Bardin 2001). Il est aussi impliqué dans la signalisation intracellulaire par réarrangement du cytosquelette d'actine (Anfosso 2001) et régule la migration transendothéliale des monocytes (Bardin 2009). Plusieurs études suggèrent un rôle du CD146 dans l'angiogenèse et la croissance tumorale, comme par exemple l'inhibition de la croissance tumorale par un anticorps anti-CD146, le AA98 (Yan 2003), ou l'inhibition de la prolifération des HUVEC quand on éteint l'expression de l'ARNm du CD146 (Kang 2006). Il existe également une forme soluble de cette molécule par protéolyse de la forme membranaire (CD146s) (Bardin 1998). Il est détecté dans le sérum humain et son niveau varie dans différentes pathologies comme les maladies inflammatoires de l'intestin (Bardin 2006), les grossesses pathologiques (Pasquier 2005) et l'insuffisance rénale chronique (Bardin 2003). On peut penser que la forme soluble contrôle les fonctions du CD146 dans les interactions et les adhésions de la monocouche endothéliale humaine (Bardin 1996; Bardin 1998), mais son rôle exact reste méconnu. Une étude récente a montré que le CD146s exerçait des propriétés chimotactique et angiogénique et induisait la néovascularisation *in vivo* dans un modèle murin d'ischémie du membre inférieur (Harhour 2010).

### **L'endogline**

C'est une glycoprotéine transmembranaire exprimée principalement à la surface des CE sous forme d'homodimères. Elle fait partie du complexe des récepteurs au TGF- $\beta$  et interagit principalement avec un récepteur de type I au TGF- $\beta$ , ALK-1 (activin-like kinase 1). Des mutations du gène codant l'endogline et ALK-1 sont impliquées dans le développement de la télangiectasie hémorragique héréditaire, qui se manifeste par des malformations artério-veineuses. L'expression de l'endogline est faible dans les CE quiescentes et augmente pendant l'angiogenèse, lors des processus de réparation de lésions, lors d'une inflammation, d'une hypoxie ou de processus tumoraux (Lopez-Novoa and Bernabeu 2010). Mais elle est aussi exprimée par d'autres types cellulaires, tels que les CML, les fibroblastes et les monocytes. La forme soluble de l'endogline est détectable par ELISA et Western blot dans le plasma, le sérum et les urines dans l'éclampsie et le cancer. Dans le cancer, son taux est corrélé avec les métastases tumorales et est de mauvais pronostic (Fonsatti and Maio 2004). Une diminution du taux sérique a été décrit chez les patients faisant un infarctus du myocarde, dans l'hypercholestérolémie et le diabète, ce qui pourrait lui conférer un rôle de marqueur de dysfonction endothéliale (Cruz-Gonzalez 2008). Une étude récente a montré que le taux d'endogline plasmatique pourrait être un marqueur prédictif d'évènements cardiovasculaires dans la maladie coronarienne chronique (Ikemoto 2012).

### **3) Marqueurs des fonctions vasomotrices**

#### **Substances vasodilatatrices : prostacycline et oxyde nitrique (Sampol and George 1995)**

La prostacycline est produite par les CE et les CML. C'est une substance vasodilatatrice et antiagrégante. C'est son métabolite stable et inactif qui est dosé par technique radio-immunologique. Sa libération est stimulée par la thrombine, la bradykinine, les forces de frottement et le contact avec les leucocytes activés. Le NO est synthétisé à partir de la L-arginine dans toutes les cellules possédant une NOS : CE, cellules nerveuses, macrophages. Son dosage est indirect et met en jeu la mesure d'une activité biologique. De nombreux médiateurs stimulent sa libération. Une diminution des taux plasmatiques de ces deux molécules a été mise en évidence dans différentes situations pathologiques : athérosclérose, vasculopathie diabétique, ischémie cérébrale, prééclampsie, purpura thrombotique thrombocytopénique, lupus.

La vasomotricité vasculaire peut également être explorée par des méthodes indirectes peu ou non invasives comme exposées dans le paragraphe précédent : injection des substances vasodilatatrices (acétylcholine, arginine), vasoconstriction dépendante de l'endothélium (inhibiteur de la synthèse de NO) ou réponse endothéliale dépendante du flux.

**Substances vasoconstrictrices : enzyme de conversion de l'angiotensine et endothéline (Sampol and George 1995)**

L'enzyme de conversion de l'angiotensine (ACE) est un récepteur de membrane de la CE à l'origine de la formation de l'angiotensine II, peptide puissamment vasoactif. Les endothélines sont des petits peptides existant sous trois isoformes dont seule l'ET-1 est produite par la CE. C'est le plus fort vasoconstricteur de l'organisme, à l'origine directe de la contraction des fibres musculaires lisses, d'où une implication importante en physiopathologie cardiovasculaire, pulmonaire et rénale. Cependant la production de l'ET-1 semble se faire principalement du côté basal de la CML, son importance dans l'exploration vasculaire reste ainsi encore hypothétique.

De réalisation simple en semi-routine, le dosage des marqueurs solubles donne accès à une exploration globale des altérations fonctionnelles et des états d'activation anormaux de l'endothélium. Mais l'interprétation des résultats pose encore des problèmes par la méconnaissance des facteurs influençant la demi-vie et la clairance de ces marqueurs. De plus, leur spécificité est limitée dans la mesure où très peu sont restreints à l'endothélium. L'intérêt de certains marqueurs dans l'exploration de l'endothélium reste également à démontrer. En effet, bien que des anomalies aient été rapportées pour les marqueurs de régulation hémostatique dans un contexte de pathologie vasculaire, aucune relation causale avec la physiopathologie endothéliale n'a jamais été vraiment démontrée. Le dosage des différentes substances vasorégulatrices n'est pas réalisable en pratique courante. Le dosage des molécules d'adhérence représente un nouveau champ d'investigation dont l'intérêt clinique doit être évalué. D'autre part, certains de ces marqueurs sont en fait un mélange de vraies molécules solubles et de formes liées à des membranes comme les microparticules.

## **II.3 Les microparticules endothéliales**

Les microparticules sont des vésicules intactes (100 nm à 1 µm de diamètre) dérivées des membranes cellulaires suite à une modification des flux calciques entraînant un remaniement des phospholipides membranaires et une modification du cytosquelette lors de processus d'activation cellulaire ou d'apoptose dans des conditions physiologiques ou pathologiques (Piccin 2007). L'étude des antigènes exprimés renseigne ainsi sur la provenance cellulaire de ces MP et leur état d'activation (Piccin 2007). La majorité des microparticules proviennent des plaquettes, voir des mégacaryocytes (Siljander 2011), d'autres sont dérivées des CE, des leucocytes ou des globules rouges et sont présentes en plus faible quantité (Tushuizen 2011). Le stimulus à l'origine de la libération de ces microparticules détermine leur nombre, leur taille, leur composition biochimique et leurs caractéristiques fonctionnelles. Seules les microparticules endothéliales (MPE) seront abordées ici.

### **1) Origine, identification**

Les MPE ont été décrites pour la première fois chez des patients présentant un lupus anticoagulant (Combes 1999). C'est une population hétérogène, présentant des marqueurs phénotypiques et des propriétés différents selon le stimulus à l'origine de leur formation. Alors que leurs mécanismes de formation *in vivo* restent peu connus, il a été démontré que leur libération *in vitro* était augmentée sous l'effet du TNF $\alpha$  (Tumor Necrosing Factor  $\alpha$ ), de la thrombine, des toxines urémiques et des espèces réactives dérivées de l'oxygène (reactive oxygen species, ROS). Une libération accrue de MPE a été observée en association avec le découplage de la eNOS, et lors d'exposition à des forces de cisaillement faibles, suggérant que les conditions physiologiques de flux, qui contribuent à la survie des CE, limitent la libération de MPE (Dignat-George and Boulanger 2011). Ce sont des évènements rares exprimant des marqueurs endothéliaux comme la VE-cadhérine, la E-sélectine, PECAM-1, ICAM-1, l'endogline, le CD146 ou l'intégrine  $\alpha_v$ . La eNOS a été également détectée dans les MPE mais aucune preuve de son activité n'a été apportée (Dignat-George and Boulanger 2011).

### **2) Quantification**

En l'absence d'expression d'antigène réellement spécifique exceptées la E-sélectine et la VE-cadhérine, la cytométrie en flux (CF) est l'outil le plus utilisé pour leur quantification permettant l'utilisation de combinaison de marqueurs et de paramètres structuraux pour les

identifier. La détection des MPE reste cependant très hétérogène car de nombreux paramètres de la technique varient, notamment les conditions de centrifugation permettant d'isoler les MP, la conservation des échantillons avant analyse ainsi que les combinaisons de marqueurs utilisés (Jy 2004; Piccin 2007). Une méthode standardisée a été proposée pour les MP plaquettaires pouvant peut-être en partie être appliquée à la quantification des MPE (Robert 2009). Les anticorps monoclonaux les plus utilisés sont le CD144, le CD146, le CD105 ou la combinaison CD31<sup>+</sup>/CD41<sup>-</sup> (Sabatier 2011). Les MPE peuvent ne pas externaliser la phosphatidylsérine ou celle-ci peut ne pas être détectable par l'annexine V, expliquant que ce marqueur ne soit pas systématiquement utilisé pour les détecter (Piccin 2007). De plus, l'expression des antigènes de surface varie en fonction du contexte clinique ainsi que de la cause de la formation de ces MPE, à savoir activation ou apoptose (Jimenez 2003). Il existe également des tests fonctionnels basés sur la mesure de leur activité procoagulante.

### **3) Activité biologique**

Les MPE ne sont pas seulement des marqueurs d'activation ou de mort endothéliale mais représentent également de véritables effecteurs cellulaires capables d'amplifier ou de moduler l'hémostase, l'inflammation, le tonus vasculaire et l'angiogenèse (Morel 2006). Elles peuvent ainsi avoir des effets aussi bien délétères que bénéfiques sur les fonctions endothéliales. L'activité procoagulante physiologique des MPE s'exprime dans de nombreuses pathologies par l'expression d'aminophospholipides et de multimères de haut poids moléculaire du facteur Willebrand (Piccin 2007). L'expression du t-PA et de l'urokinase à leur surface dans des conditions pathologiques leur confère une activité fibrinolytique (Lacroix 2012). L'apoptose aboutit systématiquement à l'activation du processus de formation des microparticules, vecteurs d'informations amplifiant l'inflammation et la thrombose (Piccin 2007). Elles sont également un signal de reconnaissance pour les monocytes et permettent la clairance des cellules apoptotiques. *In vitro*, il a été observé que des MP de différentes origines cellulaires et pathologiques induisaient une dysfonction endothéliale, principalement en altérant l'équilibre entre la production et la libération de NO et de ROS (Brodsky 2004). Leur implication dans la réponse angiogénique et la réparation vasculaire reste cependant controversée et semble dépendre du contexte clinique. En effet, une étude a montré que les MPE inhibaient l'angiogenèse *in vitro*, alors que celles provenant de plaques d'athérosclérose stimulaient la prolifération endothéliale *in vitro* et la néoangiogenèse *in vivo*, favorisant ainsi

la rupture de plaque (Tushuizen 2011). Le rôle des MPE dans la mobilisation des progéniteurs endothéliaux circulants reste également une question.

#### **4) Applications cliniques**

Bien que les MPE représentent une faible fraction des MP totales en circulation, elles constituent un marqueur émergent de la dysfonction endothéliale. Des niveaux élevés de MPE ont été rapportés dans plusieurs conditions associées à une hypoxie ou à une ischémie, telles que les syndromes coronariens aigus (Bernal-Mizrachi 2003), un accident vasculaire cérébral (Simak 2006) et l'apnée du sommeil (Yun 2010). L'augmentation des MPE a été observée comme témoin de dommage vasculaire dans les phases chroniques et crises de drépanocytose (Shet 2003), ainsi que dans le purpura thrombotique thrombocytopénique (Jimenez 2001). Une augmentation des MPE a été décrite chez des patients diabétiques, en association avec une augmentation de la rigidité artérielle et une diminution de la réactivité endothéliale (Feng 2010).

Les MPE pourraient également présenter un intérêt pronostique. En effet, une élévation de leur taux a été observée dans les syndromes coronariens aigus en association avec le type de pathologie ainsi que la récurrence des événements (Bernal-Mizrachi 2003). Des taux élevés sont associés au type de lésion et à l'évolution clinique du patient en cas d'arrêt cardiaque d'origine ischémique (Dignat-George and Boulanger 2011). Le taux de MPE pourrait alors être utilisé dans la stratification des patients et l'identification des sujets à haut risque de complications cardiovasculaires. L'addition des MPE au score de Framingham améliore la classification du risque et semble un facteur prédictif significatif et indépendant des événements cardiovasculaires dans une population à haut risque (Nozaki 2009). Le taux de MPE apparaît être le plus robuste pour prédire les infarctus du myocarde chez les patients diabétiques, en comparaison des marqueurs classiques d'activation endothéliale (Koga 2005). De même ce taux prédit l'évolution à un an des patients souffrant d'hypertension pulmonaire (Amabile 2009). Un aspect bénéfique de l'augmentation des MPE a aussi été démontré dans plusieurs contextes, tels que dans l'athérosclérose subclinique ou peu occlusive, en comparaison à l'athérosclérose établie ou symptomatique, suggérant que la capacité de l'endothélium à générer des microparticules dépendrait de son intégrité et sa viabilité (Bernal-Mizrachi 2004). De même, une augmentation précoce des taux de MPE et MPP serait prédictif d'une meilleure évolution dans le sepsis sévère en terme de mortalité et de dysfonction d'organe (Soriano 2005).

Plusieurs études suggèrent que les MPE ne seraient pas seulement un marqueur de dysfonction endothéliale mais qu'elles auraient un rôle propre dans le développement de la maladie. En effet, Amabile et al ont montré d'une part que l'augmentation des MPE chez les patients en insuffisance rénale terminale était corrélée à l'augmentation de la rigidité artérielle et inversement corrélée à la réactivité endothéliale, mais aussi que les MPE isolées chez ces patients induisaient une dysfonction endothéliale *in vitro* (Amabile 2005). La même relation entre les MPE et la fonction endothéliale a été observée dans l'obésité (Esposito 2006). L'augmentation du ratio MPE versus PEC, reflet d'un déséquilibre entre les dommages endothéliaux et la réparation, mesuré dans l'hypercholestérolémie est associée à l'augmentation de la rigidité artérielle (Pirro 2006). Les MPE isolées chez ces patients ont de plus un effet anti-angiogénique *in vitro*, avec augmentation de l'apoptose des PEC et diminution de leur potentiel clonogénique.

A ce jour, la quantification des taux de MP dans différentes conditions n'est pas appliquée dans les stratégies thérapeutique ou diagnostique concernant la prise en charge des maladies pour lesquelles elles se sont avérées intéressantes. Mais leur étude a permis d'avancer dans la compréhension des mécanismes physiopathologiques de maladies sévères. Elles pourraient être un outil important et non invasif pour la mesure des effets protecteurs précoces lors d'intervention thérapeutique. Contribuant dans certains cas au développement de la maladie, elles pourraient également représenter une cible thérapeutique. Les antioxydants, les bêtabloquants et les statines réduisent en effet les MPE (Morel 2006).

## **II.4 Les cellules endothéliales circulantes**

### **1) Identification**

Le concept de cellules endothéliales circulantes (CEC) est né dans les années 1970 avec les expériences de Bouvier et al. qui, après injection d'endotoxine à des lapins, montraient la présence dans le sang périphérique de cellules identifiées morphologiquement comme endothéliales sur des frottis colorés au May-Grünwald Giemsa (Bouvier 1970). Les CEC sont des cellules matures qui se sont détachées de la monocouche intimale suite à une agression de l'endothélium. La présence dans le sang périphérique de ces CEC pourrait représenter un bon marqueur des lésions de la paroi avec mise à nu du sous-endothélium thrombogène.



## **2) Quantification**

Dans la circulation, les CEC représentent seulement entre 0,01 et 0,0001 % des cellules mononucléées (CMN) (Woywodt 2006). Les techniques doivent donc permettre, dans un premier temps, un enrichissement de ces cellules, puis leur identification. Les premières méthodes de quantification étaient basées sur l'identification morphologique des CE sur des frottis colorés au May-Grümwald Giemsa, obtenus après séparation des CMN par un gradient de Ficoll (Bouvier 1970; Hladovec 1978). En 1983, Takahashi et al ont mis au point une technique d'identification des CE avec un anticorps anti-FVW en immunofluorescence indirecte (Takahashi and Harker 1983). Mais le FVW est également exprimé à la surface des plaquettes. En 1985, une série d'anticorps monoclonaux a été étudiée, dont le CLB-HEC19. Il reconnaît une protéine membranaire spécifique des CE, ne réagissant ni avec les cellules sanguines, ni avec les fibroblastes, ni avec les CML (Sbarbati 1991). C'est l'introduction d'anticorps plus spécifiques des CE tels que le S-Endo1 dans les années 1990 (George 1991), qui a permis le développement de deux nouvelles techniques de quantification par l'équipe de F. Dignat-Georges : l'immunoséparation magnétique (IMS) et la cytométrie en flux (CF) . Son antigène, le CD146, est largement exprimé à la surface des CE ( $4.10^5$  sites/HUVEC), ce qui rend possible la détection d'événements rares (George 1991). De plus, le S-Endo 1 se lie peu aux leucocytes et aux plaquettes. En 1997, Solovey et al. ont utilisé un nouvel anticorps monoclonal anti-CD146, le P1H12, dans la drépanocytose (Solovey 1997). Cet anticorps reconnaît des endothéliums de différents tissus et différentes espèces. Le CD146 est l'antigène de choix comme marqueur des CEC. Cependant, il a aussi été décrit sur d'autres cellules de la paroi vasculaire, ainsi que des cellules malignes (Bardin 1996). Des précautions dans l'analyse sont donc nécessaires pour en assurer la spécificité.

### **2.1 L'immunoséparation magnétique**

L'IMS est une technique adaptée à la détection des événements rares. Des billes magnétiques sont recouvertes d'un anticorps monoclonal, le S-Endo 1, reconnaissant l'antigène CD146, et mises en contact avec le sang total. Les billes se fixent alors à la surface des CEC. L'utilisation d'un portoir magnétique qui retient les billes le long de la paroi permet une élimination facile de tous les éléments n'exprimant pas le CD146. Les cellules isolées sont ensuite comptées en cellule de Nageotte au microscope à fluorescence après une incubation avec de l'acridine orange, qui s'incorpore à l'ADN et confère aux cellules une

fluorescence et/ou un marquage avec de l'isolectine B4 spécifiquement endothéliale. Les CEC sont définies comme des cellules fluorescentes d'au moins 10 µm avec plus de 5 billes fixées et dont les contours sont visibles en lumière blanche. La quantification des CEC par IMS et marquage à l'acridine orange demande de l'expérience et du temps technique. Depuis son développement en 1992, cette méthode a été progressivement modifiée afin d'améliorer la rentabilité de l'isolement et de faciliter l'identification des cellules. Parmi les améliorations qui ont été apportées, l'addition d'albumine et d'EDTA a permis de diminuer l'auto-agrégation des CEC. L'utilisation de la lectine Ulex Europeus-1 (UEA-1) facilite la différenciation des lymphocytes activés CD146<sup>+</sup> et des CEC (Woywodt 2004). L'utilisation d'un agent bloquant des récepteurs Fc minimise la fixation non spécifique des leucocytes. Les CEC isolées peuvent également être doublement marquées pour d'autres analyses avec le CD133, le CD34 ou des molécules d'adhésion (Blann 2005). Avec l'IMS, le nombre de CEC chez le sujet normal est compris entre 0 et 10 cellules/mL (Woywodt 2006).

Cependant, la numération des CEC est un examen techniquement exigeant. Pour avoir un échantillon sanguin de bonne qualité, les premiers millilitres recueillis doivent être éliminés afin d'éviter la contamination par des CE détachées lors du prélèvement (Woywodt 2006). La conservation du prélèvement est, d'autre part, assez courte : les CEC disparaissent en quelques heures à température ambiante (George 1992). L'examen doit donc être réalisé moins de 4 heures après le prélèvement. Des précautions sont à prendre lors des différentes étapes de l'IMS afin de limiter la perte de cellules. La difficulté principale réside dans l'étape de lecture de la suspension finale au microscope à fluorescence. En effet, il est important de différencier les CEC des autres éléments fluorescents. Les artéfacts n'ont pas de morphologie cellulaire ni de contour net. Les lymphocytes activés expriment le CD146 (Elshal 2005) mais sont plus petits que les CEC. De plus, la densité en antigène CD146 à la surface des CE est beaucoup plus importante que sur les lymphocytes, élément qui a été étudié lors de la mise au point de la technique (Dignat-George 2007). Les progéniteurs endothéliaux circulants (PEC) peuvent également exprimer le CD146 selon certaines études, mais sont des cellules rondes de moins de 10 µm (Delorme 2005).

L'hétérogénéité des techniques et des définitions des CEC a conduit à la proposition d'une standardisation de l'IMS par Woywodt et al. en 2006 (Woywodt 2006). La taille des CEC est très variable, allant d'amas de cellules multinucléées aux cellules entières et aux microparticules. De plus, la morphologie varie selon les pathologies. Une définition consensuelle des CEC a donc été proposée : les CEC sont des cellules nucléées ou non, de

plus de 10  $\mu\text{m}$  de longueur, avec plus de cinq billes fixées et qui sont positives au marquage par la lectine UEA-1.

## 2.2 La cytométrie en flux

La cytométrie en flux est l'alternative à l'IMS. Elle présente un intérêt pour sa rapidité d'analyse des cellules à individualiser parmi des populations hétérogènes, et pour leur quantification. L'utilisation simultanée de plusieurs anticorps est d'un grand intérêt et facilite l'exclusion des éléments contaminants. Le CD45 est couramment utilisé pour exclure les cellules hématopoïétiques qui sont  $\text{CD45}^+$ . Les CEC sont identifiées par leur expression du CD31 et du CD146 et l'absence de CD133 (Mancuso 2001). L'utilisation de l'expression du CD133 comme marqueur de différenciation entre CEC et PEC sera cependant abordée dans la partie concernant la numération des PEC par CF. L'avantage de la CF est de pouvoir détecter les sous-populations selon l'intensité de fluorescence, de différencier les cellules apoptotiques des cellules vivantes, et les cellules activées ( $\text{CD105}^+$ ) des cellules au repos (Blann 2005). Cependant, la sensibilité de cette technique rapportée dans l'étude de 1991, était de 180 CEC/mL, ce qui est insuffisant pour déterminer les valeurs de CEC chez les individus sains (George 1991). Des différences entre les résultats de plusieurs équipes utilisant la CF (Erdbruegger 2006) ont été observées avec respectivement un nombre de 77 et 1200 CEC/ml pour Del Papa (Del Papa 2004) et Mancuso (Mancuso 2003) (**Tableau I**). Ceci est probablement lié au manque de standardisation dans la définition phénotypique des CEC, dans le choix des couples d'anticorps utilisés ainsi que dans la détermination des fenêtres d'analyse. Quelques exemples de combinaison de marqueurs sont présentés dans le **tableau I**.

En 2005, Khan et al proposent des recommandations afin d'améliorer la détection des événements rares (Khan 2005). Des molécules marquant le noyau permettent d'éliminer les agrégats plaquettaires et les MPE. L'utilisation de plusieurs contrôles isotypiques permet de réduire le bruit de fond. Il faut éliminer les cellules mortes ou en apoptose qui fixent les anticorps de manière non spécifique en utilisant un marqueur de mort cellulaire comme l'iodure de propidium ou le 7-AAD (7-aminoactinomycine D). Une incubation de 15 minutes avec du sérum avant le marquage permet de diminuer la fixation non spécifique. Il est recommandé de collecter un grand nombre d'événements et de faire un cycle de lavage de plus de 30 minutes avant le comptage au cytomètre pour éviter les contaminations. Enfin, un canal de fluorescence est réservé aux marqueurs des cellules à éliminer telles que les lymphocytes.

En 2007, Rowand *et al* ont mis au point un système automatisé de quantification des CEC, le système CellTracks® (Immunicon Corp), qui couple l'enrichissement en CEC, l'utilisation de marqueurs secondaires et la morphologie des cellules par analyse d'image et pourrait permettre d'améliorer la reproductibilité et de faciliter la lecture des résultats (Rowand 2007). Après addition de 10 ml de tampon, 4 ml de sang total sont centrifugés et placés dans le système automatisé. L'enrichissement se fait par un ferrofluide couplé à l'anticorps anti-CD146. Puis des anticorps couplés à des fluorochromes sont ajoutés, un colorant nucléaire (DAPI), le CD105-PE (phycoérythrine) qui est exprimé principalement sur les CE et élimine les débris cellulaires, et le CD45-APC (allophycocyanine). Après lavage, les cellules fixées à l'anti-CD146 sont alignées grâce à deux aimants, placées devant un microscope à fluorescence semi-automatique, et un appareil scanne les cellules pour chaque canal de fluorescence. Les images sont transmises à un analyseur qui présente les cellules une par une et pour chaque canal de fluorescence. Ainsi, l'opérateur classe les cellules en CEC d'après la positivité des marqueurs, révélée par les images et la morphologie des cellules aidé par un contrôle positif. Le logiciel calcule le nombre de CEC pour 4 ml de sang. Cette nouvelle technique permettrait d'améliorer la reproductibilité et de faciliter la lecture des résultats. Ces approches fournissent des valeurs du même ordre de grandeur que l'IMS. Mais l'analyse des cellules est longue et le système est très onéreux ainsi que les réactifs servant pour une analyse.

Une technique hybride a été proposée en 2008, couplant une étape d'immunoséparation magnétique avec des ferrofluides retenant les cellules CD146<sup>+</sup> puis une étape de cytométrie, le kit CELLQUANT FF CD146 (Biotex). Les CEC sont définies comme CD45<sup>dim</sup> (à cause de leur autofluorescence) CD146<sup>+</sup> et positive pour le marqueur nucléaire (Widemann 2008). Contrairement à d'autres techniques de cytométrie, les résultats obtenus étaient comparables à ceux de l'IMS. L'identification des CEC sur la base du phénotype suivant CD31+CD146+CD45-7AAD-, a donné des résultats du même ordre qu'avec l'IMS (Jacques 2008). Par contre, il a été montré que les cellules CD31++CD34+CD45-CD133- identifiées par Duda et al (Duda 2007) correspondaient en fait à de larges plaquettes (Strijbos 2007). Cette observation a été confirmée quelques années plus tard, avec le développement de la PFC (polychromatic flow cytometry). Elle repose sur des nouvelles pratiques dans les réglages et la stratégie d'analyse (Mahnke and Roederer 2007). Elle inclue un marqueur érythrocytaire et un marqueur de viabilité. La fixation du seuil négatif du signal est réalisée avec des tubes contenant l'ensemble des anticorps sauf celui

d'intérêt, le contrôle "FMO" (fluorescence minus one). Cette utilisation de la CF a apporté des améliorations importantes dans la détection des événements rares. L'étude de Mund publiée cette année (Mund 2012) a comparé l'utilisation de la CF conventionnelle proposée par Duda et al en 2007 (Duda 2007) et une méthode de cytométrie en flux multicolore basée sur les recommandations de la PFC (Estes 2010). Ils ont ainsi montré une différence importante entre les deux techniques avec  $0,262 \pm 0,986\%$  de CEC avec la technique conventionnelle versus  $0,150 \pm 0,0563\%$  avec la PFC. L'utilisation d'un marqueur nucléaire a montré que les CEC étaient contaminées par des vésicules extracellulaires endothéliales et plaquettaires.

### 2.3 Conclusion

La diversité entre les techniques (IMS-CF) semble finalement surtout liée à la stratégie d'identification des cellules par cytométrie en flux. L'IMS, les gradients de centrifugation et quelques méthodes de CF donnent des résultats similaires avec des valeurs de l'ordre de 10 CEC/mL. Dans l'IMS, le plus faible nombre de CEC rapporté, en comparaison avec la CF, peut être lié aux multiples étapes de lavage responsables d'une perte de cellules (Goon 2006). Les performances et le développement de la nouvelle méthode automatisée sont en cours d'évaluation.

### 3) Applications cliniques

Les CEC sont des cellules matures qui se sont détachées de la monocouche intinale suite à une agression ou une activation de l'endothélium. La présence dans le sang périphérique de ces cellules pourrait représenter un bon marqueur des lésions de la paroi avec mise à nu du sous-endothélium thrombogène, comme le montre le taux élevé de CEC détectées dans des situations variées mais présentant toutes une atteinte endothéliale : pathologies cardiovasculaires, infectieuses, immunologiques, la transplantation et le cancer (**Tableau I**). Dans la plupart des pathologies, l'augmentation du nombre de CEC semble être associée à une élévation des taux plasmatiques de marqueurs d'activation de l'endothélium incluant le facteur Willebrand (vWF) (Blann 2005), la thrombomoduline soluble ou les molécules d'adhésion solubles (ICAM-1, VCAM-1, E et P-sélectines), suggérant que l'activation pathologique de l'endothélium conduirait au détachement cellulaire. Par ailleurs, le taux de CEC semble varier avec l'étendue des lésions. En effet, les valeurs les plus élevées sont trouvées dans les atteintes généralisées de l'endothélium telles que la rickettsiose, la vascularite avec présence d'ANCA (anticorps anti-cytoplasme des polynucléaires), l'infection

à cytomégalovirus. Un taux bas de CEC dans le sang périphérique est le reflet de l'intégrité vasculaire et de son bon fonctionnement. Ainsi, les CEC représentent un marqueur non invasif de l'altération endothéliale (Figure lésion/réparation). Dans les syndromes coronariens aigus sans sus-décalage du segment ST (Quilici 2004), elles sont un marqueur plus précoce que la troponine. Leur taux pourrait même être un indicateur de la sévérité de la pathologie. L'utilisation des CEC a été envisagée pour évaluer l'efficacité thérapeutique dans le traitement du cancer. Mancuso et al. ont montré, chez des patients atteints d'un cancer du sein sous traitement anti-angiogène, une corrélation entre une survie prolongée et des taux de CEC supérieurs à 11 CEC/ $\mu$ L à deux mois de traitement, ces CEC étant principalement des cellules apoptotiques soulignant l'efficacité du traitement (Mancuso 2006). D'autres études ont associé une diminution des CEC à une bonne réponse au traitement anti-angiogénique (Calleri 2009).

À côté de ces données quantitatives, la caractérisation des CEC par leur morphologie ou leur phénotype apporte des informations très utiles pour la compréhension des mécanismes physiopathologiques. Ainsi, il faut souligner l'hétérogénéité morphologique des cellules isolées en fonction du processus pathologique : cellules morphologiquement intactes mais de tailles différentes après angioplastie et dans la drépanocytose, cellules d'aspect nécrotique dans les infections à rickettsies et les vascularites à ANCA, cellules apoptotiques ou formations multinucléées typiquement rencontrées dans les syndromes coronariens aigus (Blann 2005). L'étude du phénotype des CEC apporte des informations sur leur origine par l'expression du CD36, par exemple : microvasculaire (CD36+) dans les crises vaso-occlusives drépanocytaires (Solovey 1997) ou macrovasculaire (CD36-) dans l'infarctus du myocarde (Mutin 1999). Le développement de marqueurs spécifiques du site vasculaire permettrait ainsi de localiser les lésions endothéliales. L'étude de l'expression de certains antigènes par les CEC nous informe également de l'état activé ou non de l'endothélium dans la pathologie (Blann 2005). Toutes ces informations apportées par le phénotype permettent d'avancer dans la compréhension des mécanismes physiopathologiques. La numération des CEC apporte des informations complémentaires dans le diagnostic, le pronostic et le suivi de l'efficacité thérapeutique des maladies vasculaires.

**Tableau I : Exemples de numération des CEC indiquant la méthode utilisée et les valeurs obtenues dans différentes pathologies.**

	Nombre de CEC/ml		Phénotype	Technique	Références
	Patients	Contrôles			
Syndrome coronariens aigus					
Infarctus du myocarde	7,5 [4,1-43,5]	0	CD146 (S-Endo1)	IMS	Mutin 1999
Infarctus du myocarde	25,5 [8-35,3]	<3	CD146 (S-Endo1)	IMS	Quilici 2004
Infarctus du myocarde	4,9 [3,6-8,4]	1[0,5-1,7]	CD146 (S-Endo1)	IMS	Makin 2004
Accident ischémique cérébral	15,5 [10,8-20,7]	2,7 [1,6-3,7]	CD146 (S-Endo1)	IMS	Nadar 2005
Maladies immunologiques					
Vascularite associée aux ANCA	136 [20-5700]	5 [0-20]	CD146 (S-Endo1)	IMS	Woywodt 2003
Sclérose systémique	243-375	77	CD34+CD45-CD146+ (P1H12)	CF	Del Papa 2004
Maladie de Kawasaki	21 +/- 2,1	3,2 +/- 0,4	CD146 (P1H12)	IMS	Nakatani 2003
Lupus érythémateux disséminé	32 +/- 7	5 +/- 2	CD146 (P1H12)	DC	Clancy 2001
Maladies infectieuses et systémiques					
Rickettsiose	162 +/- 454	6 +/- 7	CD146 (S-Endo1)	IMS	George 1993
Crise vaso-occlusive drépanocytaire	22,8 +/- 18,2	2,6 +/- 1,6	CD146 (P1H12)	IMS	Solovey 1997
Choc septique	30,1 +/- 3,3	1,9 +/- 0,5	Anti-FVW	IHC	Mutunga 2001
Transplantation					
Rénale	24-72	6	CD146 (S-Endo1)	IMS	Woywodt 2003
Moelle osseuse	16-44	8	CD146 (S-Endo1)	IMS	Woywodt 2004
Cancer					
Sein et lymphomes	39100 [16800-61400]	7900 [4700-11100]	FSC <sup>dim</sup> SSC <sup>low</sup> CD31 <sup>++</sup> CD45 <sup>-</sup> CD146 <sup>+</sup>	CF	Mancuso 2001
Cancer rectal			CD31 <sup>++</sup> CD34 <sup>+</sup> CD45 <sup>2</sup> CD133 <sup>2</sup>	CF	Duda 2006
Cancers métastasés	15 [0-179]	6,5 [0;15]	CD31 <sup>+</sup> CD146 <sup>+</sup> CD45 <sup>7</sup> AAD <sup>-</sup>	CF	Jacques 2008
Tumeurs solides	951+/-1876	140+/-171	Syto16 (ADN)+ CD45-CD31+CD146+		Mancuso 2009
Autres					
Angioplastie coronaire	59 +/- 12,5	2,4 +/- 0,9	CD146 (S-Endo1)	IMS	Bonello 2006
Angioplastie coronaire	11	1	CD146 (S-Endo1)	IMS	George 1992
Angioplastie coronaire	6-10	< 3	HEC19	IHC	Sbarabati 1991
Insuffisance cardiaque congestive	11,8 (4,6-18,4)	3,7 (1,3-7,2)	CD146 (S-Endo1)	IMS	Chong 2004
Hypertension pulmonaire (HTAP)	30	3,5	CD146 (P1H12)	DC + IHC	Bull 2003

IMS: Immunoséparation magnétique

IHC : Immunohistochimie

CF: Cytométrie en flux

DC: densité de centrifugation

### **III) Les marqueurs de la réparation endothéliale : les progéniteurs endothéliaux circulants**

#### **III.1 Réparation endothéliale et notion de vasculogénèse post-natale**

Il existe 3 mécanismes de réparation endothéliale : la diffusion de CE adjacentes (angiogénèse), l'hyperplasie des cellules existantes ou l'insertion de cellules progénitrices circulantes (vasculogénèse). La réparation par les CE différenciées qui ont préservé un potentiel de prolifération est sous le contrôle de facteurs exogènes sécrétés dans les tissus adjacents, mais il reste limité par le mécanisme de sénescence et par l'incapacité des cellules matures à s'intégrer dans des sites éloignés.

##### **1) Preuve de concept**

Le concept de "vasculogénèse post-natale" est né suite à la découverte de l'existence de progéniteurs endothéliaux circulants (PEC) CD34+ KDR+ par Asahara et al en 1997 (Asahara 1997). Les PEC dérivant principalement de la moelle osseuse (Lin 2000) ont la capacité de se différencier en cellules matures démontrant ainsi l'existence d'un mécanisme complémentaire de l'angiogénèse pour assurer la réparation endothéliale (Asahara 1997; Shi 1998; Asahara 1999). La mobilisation de ces cellules à partir de la moelle osseuse constitue une réponse naturelle à l'ischémie tissulaire, avec une migration des PEC sur le site de l'ischémie puis intégration dans les nouveaux vaisseaux. Plusieurs études ont montré l'incorporation des cellules dérivées de la moelle osseuse dans les vaisseaux dans différentes situations : au niveau des sites tumoraux (Lyden 2001), lors de blessures (Asahara 1999; Tepper 2002), dans les sites de dénudation endothéliale (Li 2006), après des infarctus du myocarde expérimentaux chez la souris (Jackson 2001). Ces résultats ont été confirmés chez l'homme avec la mobilisation rapide mais transitoire de PEC chez les patients ayant subi un pontage aorto-coronarien (Scheubel 2003) ou des brûlures (Gill 2001), dans l'infarctus du myocarde (Shintani 2001) et lors du renouvellement physiologique de l'endothélium (Jiang 2004). La néovascularisation induite par les PEC adultes semble comprendre à la fois des processus d'angiogénèse et de vasculogénèse (Murasawa and Asahara 2005). Plusieurs études ont estimé la contribution des progéniteurs endothéliaux dérivés de la moelle osseuse à la formation de nouveaux vaisseaux sanguins à 5 à 20% en réponse à la formation de granulomes (Crosby 2000) ou à une néo-vascularisation induite par des facteurs de croissance (Murayama 2002).



## 2) Vasculogénèse post-natale

Le processus de vasculogénèse post-natale se fait en 3 étapes : mobilisation des PEC depuis leur réservoir médullaire, recrutement sur des sites ischémiques ou lésés, et différenciation en CE (Napoli 2012).

La mobilisation est régulée par l'hypoxie, une lésion de la paroi vasculaire, des plaques athérogéniques, une thrombose coronarienne ou un pontage, qui recrute des progéniteurs endothéliaux et augmentent leur nombre en circulation (Takahashi 1999; Kalka 2000; Kalka 2000; Gill 2001). Le traumatisme vasculaire entraîne la libération de VEGF et de cytokines qui induisent le recrutement des progéniteurs endothéliaux (Takahashi 1999). L'hypoxie d'un territoire ischémié active la stabilisation de HIF-1 $\alpha$  (hypoxic-inducible transcription factor) par inactivation des prolyl-hydroxylases (PHD) dont l'activité est oxygène-dépendante. Au lieu d'être dégradé par le protéasome, celui-ci est alors transloqué dans le noyau où elle interagit avec son hétérodimère et peut induire l'expression de facteurs angiogéniques comme le VEGF, le SDF-1 (stromal cell-derived factor 1), l'angioïétine 2 et le SCF (Stem cell factor ou Kit ligand) proportionnellement à la diminution de la pression en oxygène (Ceradini 2004). Le VEGF active la prolifération et la survie cellulaire par liaison à ses récepteurs VEGFR-1 et VEGFR-2 et la voie de signalisation phosphatidylinositol 3'kinase/AKT (Li 2006). Le SDF-1 se lie au CXCR4 exprimé par les PEC augmentant leur mobilisation et les guidant vers le site lésé de nigris (de Nigris 2007). D'autres cytokines comme le G-CSF (granulocyte colony-stimulating factor) favorise également la mobilisation des progéniteurs endothéliaux et la régénération vasculaire Takamiya (Takamiya 2006). Le NO est un médiateur essentiel de la réactivité endothéliale et à l'angiogénèse, que ce soit suite à l'ischémie ou induite par un facteur exogène. Une diminution du NO augmenterait la sensibilité des CE aux stimuli apoptotiques et diminuerait la mobilisation des PEC dépendante du VEGF (Aicher 2003). L'activation de la métalloprotéase matricielle 9 (MMP-9) lui permet de cliver le ligand membranaire kit présent à la surface des cellules stromales. Le kit soluble libéré permettant ainsi aux cellules souches et PEC exprimant le cKit de proliférer et migrer vers les zones vascularisées de la moelle osseuse (Heissig 2002). Le SDF-1 est aussi un substrat de la MMP-9. Par sa fixation au CXCR4 exprimé sur les CSH et les progéniteurs endothéliaux, le SDF-1 des cellules stromales retient ces cellules dans la moelle. Le clivage du SDF-1 permet donc la mobilisation de ces progéniteurs vers le sang (Sugiyama 2006). La libération de noradrénaline au niveau médullaire induit la mobilisation des cellules par un mécanisme dépendant de la eNOS.

Le recrutement fait intervenir plusieurs voies. L'augmentation du VEGF par l'hypoxie active la voie de la NOSe et augmente l'expression du SDF-1 et de MIF (macrophage migration inhibitory factor) au niveau du site ischémié, favorisant ainsi le recrutement des progéniteurs endothéliaux et des cellules progénitrices du muscle lisse. Le couple intégrine  $\beta 2$ /ICAM-1 est également impliqué, avec une augmentation de l'expression d'ICAM-1 après ischémie. Le recrutement est également influencé par le eNOS par augmentation de l'expression de la proMMP-9 (Aicher 2003). Récemment, il a été montré que le système IGF2 (Insulin-like growth factor)/IGF2R induisait le homing des PEC (Maeng 2009). L'IGF2 généré dans les sites ischémiés ou tumoraux contribuerait alors à la vasculogénèse post-natale. Des chimiokines et divers facteurs de croissance permettent aussi le recrutement de ces cellules. Les plaquettes contribuent également au recrutement des cellules avec notamment la libération de composés angiogéniques, tels que le SDF-1 (Massberg 2006). Elles contiennent aussi des substances anti-angiogéniques telles que la thrombospondine-1 (Italiano and Battinelli 2009).

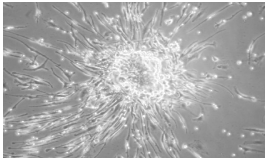
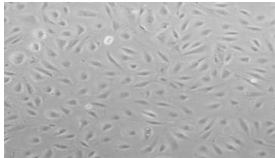
Au niveau du site ischémié, les cellules progénitrices peuvent se différencier en CE, voir en CML, ou sécréter des facteurs paracrines. Certains progéniteurs endothéliaux, restant dans le tissu interstitiel, contribuent de manière indirecte à la réparation des vaisseaux par sécrétion de cytokines proangiogènes et de facteurs de croissance, qui stimulent la prolifération et la migration des CE pré-existantes et activent l'angiogénèse.

### **III.2 Caractérisation des progéniteurs endothéliaux circulants**

#### **1) Définition**

La définition des PEC n'est pas clairement établie et comprend plusieurs populations selon la méthode d'analyse utilisée, ces cellules étant des événements rares. Dès 2004, une distinction en cellules dites "précoces" et "tardives" selon leur cinétique d'apparition en culture a été proposée par Hur (Hur 2004). Ces cellules différaient par leur phénotype et leurs caractéristiques fonctionnelles (**Tableau II**). Les méthodes d'isolement classiques reposent sur la mise en culture des cellules mononucléées totales après séparation sur gradient de Ficoll ou de populations de CMN triées par immunoséparation magnétique : sélection positive ou négative par l'utilisation de microbilles recouvertes d'anticorps spécifiques de marqueurs d'immaturité (CD133, CD34), endothéliaux (CD146) ou monocytaires (CD14).

**Tableau II : Caractéristiques des PEC précoces et tardifs**

	PEC précoces	PEC tardifs
<i>Nomenclature</i>	EPC, CFU-EC, CAC, early outgrowth CE-EPC	EPC, ECFC, late EPC, late EOC
<i>Délai d'apparition en culture</i>	4-7 jours	> 7 jours
<i>Morphologie</i>		
<i>Phénotype</i>	FVW, KDR, VE-cadhérine, CD31 CD14, CD45	CD31, CD34, CD105, CD146, VE-cadhérine, KDR, BMP 2/4
<i>Prolifération</i>	+/-	+++
<i>Tubes en matrigel</i>	-	+++
<i>Sécrétion de cytokines</i>	+++	-
<i>Potentiel angiogénique in vivo</i>	+++	+++
<i>Origine</i>	Hématopoïétique (monocytaire) : CD34+CD45+, CD133+CD45+, CD34- CD45+, CD14+CD45+	Non hématopoïétique : CD45-CD133-CD34+

EPC : endothelial progenitor cells

CFU-EC : colony forming unit of endothelial cells

CAC : circulating angiogenic cells

CE-EPC : culture expanded endothelial progenitor cells

ECFC : endothelial colony-forming cells

EOC : endothelial outgrowth cells

### ➤ Les PEC précoces

Les PEC précoces ou EC-like cells ou CFU-Hill ou CFU-EC sont des cellules adhérentes qui, après quatre à sept jours de culture, présentent les marqueurs leucocytaires CD14 et CD45 et certaines des caractéristiques phénotypiques des CE : CD31+, KDR+, TIE-2+, FVW+. Les phénotypes d'expression de marqueurs endothéliaux observés avec les PEC précoces varient entre les études en raison de l'évolution du phénotype au cours de la culture et de l'hétérogénéité de ces cellules. Leur potentiel de prolifération est faible mais elles sont capables de migrer vers les sites de croissance tumorale et contribuent à la formation de vaisseaux fonctionnels *in vivo* (Sharpe 2006). Elles exercent leurs propriétés angiogéniques par la sécrétion de nombreuses cytokines proangiogéniques *in vivo* (Rehman 2003; Hur 2004). Ce sont les cellules identifiées initialement par Asahara et al. en 1997 (Asahara 1997) et à propos desquelles les travaux publiés sont les plus nombreux. Il est notamment démontré que le nombre de PEC précoces est inversement corrélé au risque cardio-vasculaire (Hill 2003).

## ➤ Les PEC tardifs

Les PEC « tardifs » ou late-endothelial outgrowth cells (l-EOC) ou endothelial colony forming cells (ECFC), donnent naissance à des colonies adhérentes apparaissant en deux à trois semaines, à fort potentiel de prolifération identifiées par Lin et al (Lin 2000). Les cellules qui en dérivent après expansion ont un phénotype endothélial plus prononcé que les PEC early. Ces PEC tardifs expriment le CD34 et le récepteur du VEGF (VEGFR2 ou KDR), mais pas le CD45 ni le CD14.

En 2004, Ingram et al ont montré que les ECFC étaient constituées d'une hiérarchie de progéniteurs avec des potentiels de prolifération différents, de la même façon que la classification établie pour les cellules souches hématopoïétiques grâce à un test clonogénique (Ingram 2004). Les ECFC à fort potentiel de prolifération (HPP-ECFC) forment des colonies macroscopiques pouvant donner des colonies secondaires et tertiaires après repiquage. Ils peuvent de plus donner naissance à tous les stades de progéniteurs endothéliaux. Les ECFC à faible potentiel de prolifération (LPP-ECFC) forment des colonies de plus de 50 cellules, mais ils ne peuvent pas former d'autres ECFC après repiquage. Ils donnent naissance à des groupes de CE de moins de 50 cellules, qui ne peuvent être repiqués. Le stade de LPP-ECFC représente le stade de PEC le plus prolifératif pouvant être isolé du sang périphérique adulte, contrairement au sang de cordon où des HPP-ECFC ont également été identifiées. Bien qu'agissant en synergie avec les PEC précoces pendant la réparation vasculaire, les ECFC s'intègrent dans le vaisseau, alors que les PEC précoces participent à la néovascularisation de façon paracrine, par sécrétion de facteurs angiogéniques favorisant la réparation structurale par les CE résidentes et les ECFC incorporés, ce pourquoi ils sont parfois appelées cellules angiogéniques. Au total, les ECFC présentent des propriétés clonogéniques, une forte activité télomérase, la capacité de former des tubes *in vitro* et de former des vaisseaux *in vivo* dans un modèle de souris immunodéficiente et peuvent être amplifiées en culture (Ingram 2004). Ils suscitent ainsi un véritable intérêt comme produit de thérapie cellulaire dans les pathologies ischémiques.

## 2) Quantification

Aucune étude n'a permis d'identifier un marqueur spécifique des PEC, qu'ils soient des CFU-EC ou des ECFC. Deux approches principales sont utilisées : la culture incluant les tests de formation de colonies, et la numération de sous-populations par leurs marqueurs de surface, principalement par cytométrie en flux. Cependant, on ne sait pas si les cellules

identifiées en culture cellulaire existent réellement ou si elles ne représentent que des phénotypes obtenus artificiellement dans des conditions spécifiques de culture.

## **2.1 La culture cellulaire**

### **➤ Culture des PEC précoces**

Deux méthodes de cultures conduisent à l'obtention de cellules correspondant à des PEC précoces (**Figure 7**, méthodes A et B).

#### **CAC (Kalka 2000; Gulati 2003; Rehman 2003)**

C'est cette technique qui a été utilisée au départ pour étudier les PEC (Asahara 1997). Les CMN étaient ensemencées dans un milieu de culture enrichi en facteurs de croissance pour la lignée endothéliale, l'EGM2 (Endothelial growth medium 2). Après 3 jours de culture, les cellules non adhérentes étaient éliminées. Puis les colonies de PEC précoces étaient quantifiées au bout de 4 à 7 jours de culture selon les protocoles. Ces cellules expriment les mêmes marqueurs et ont les mêmes fonctions *in vitro* que les CFU-EC (cf infra).

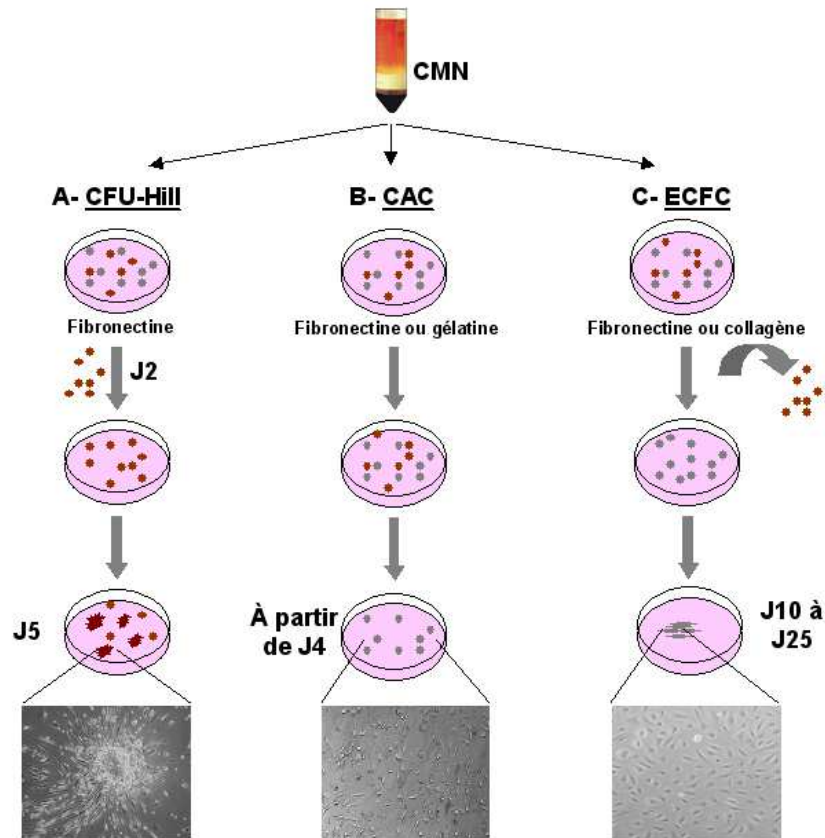
#### **CFU-EC ou CFU-Hill (Hill 2003)**

Cette technique a été développée par Hill et al et peut être réalisée par utilisation d'un kit commercial, l'Endocult® (StemCell Technologies). Les CMN isolés du sang périphérique ou du sang de cordon sont ensemencées dans le milieu Endocult, à une concentration de  $5.10^6$  CMN par puits de plaque 6 puits "coatés" avec de la fibronectine. Après 48 heures, les cellules non adhérentes sont réensemencées à une concentration de  $1.10^6$  CMN par puits de plaque 24 puits coaté par de la fibronectine. Après 3 jours, soit à J5, les colonies de CFU-EC sont comptées. Elles sont formées d'un centre de cellules rondes entourées de cellules fusiformes. La sélection des cellules non adhérentes devait permettre d'éliminer les monocytes/macrophages mais ces colonies expriment également des marqueurs monocytaires. Les CFU-Hill ne présentent pas toutes les caractéristiques morphologiques des PEC précoces, car seules les cellules fusiformes sont observées dans les cultures de PEC précoces/CAC. Par ailleurs, on obtient un nombre beaucoup plus important de CAC que de CFU-Hill en culture.

### **➤ Culture des PEC tardifs ou ECFC**

Dans cette technique, les CMN sont ensemencées sur du collagène-I de rat dans un milieu de culture enrichi spécifique de la lignée endothéliale, l'EGM2 (**Figure 7**, méthode C). Ici, les

cellules non adhérentes sont éliminées dès les premiers jours de culture. Les colonies apparaissent entre 10 et 20 jours de culture à partir du sang périphérique, 5 à 7 jours si les CMN viennent de sang de cordon. Aucune équipe à ce jour n'a pu obtenir des ECFC à partir de CMN isolées de la MO. En effet, seules les cellules mésenchymateuses, qui ont un net avantage de prolifération, sont obtenues et elles ne se différencient pas en CE (Zhang 2007).



**Figure 7 : Méthodes de culture des différentes sous-populations de PEC**

Plusieurs facteurs influencent la prolifération et la différenciation des cellules en culture : les facteurs de croissance utilisés, la matrice d'adhésion des cellules, le contact avec une matrice extra-cellulaire ou un type cellulaire spécifique etc. La nature de la matrice extracellulaire est très importante. Celle-ci est en effet impliquée *in vivo* dans la régulation de la migration, la prolifération et la survie des CE (Davis and Senger 2005). De plus, elle permet le processus de morphogénèse vasculaire par la transmission de signaux via les intégrines qui contrôlent le cytosquelette d'actine. La culture des ECFC nécessite d'être uniformisée, différentes conditions ont en effet été utilisées pour leur culture et sont répertoriées dans le **tableau III**.

**Tableau III : Exemples de conditions de culture des ECFC**

Type de cellules ensemencées	Matrice	Milieu de culture	Conditions d'ensemencement	Changement du milieu	Références
PB-MNC	fibronectine	EGM2	-	A J1 puis tous les jours	Gulati 2003
PB-MNC	fibronectine	EGM2	$2,5 \times 10^6/\text{cm}^2$	-	Urbich 2003
PB-MNC	fibronectine	EGM2	$0,83 \times 10^6/\text{cm}^2$	-	Romagnani 2005
PB-MNC	fibronectine	EGM2	$1,04 \times 10^6/\text{cm}^2$	-	Deschaseaux 2007
PB-MNC	collagène I de rat	EGM2	-	A J1 puis tous les jours	Lin 2000
CMN-SC	collagène I de rat	EGM2	$2,6 \times 10^6/\text{cm}^2$ pour CB-MNC	-	Case 2007
PB ou UCB-MNC	collagène I de rat	EGM2	-	A J1 puis tous les jours jusqu'au 1er passage	Yoder 2007
PB-MNC	collagène I de rat	EGM2	-	Tous les 2-3 jours	Au 2008
PB-MNC	collagène I de rat	EGM2	-	A J1 puis tous les jours jusqu'au 1er passage	Avouac 2008
PB-MNC	collagène I de rat	EGM2	-	A J2 puis deux fois par semaine	Massa 2009
PB-MNC	collagène I de rat	EGM2	$3,54 \times 10^6/\text{cm}^2$	A J1 puis tous les jours	Stroncek 2009
PB ou mobPB-MNC	collagène I de rat	EGM2	$3,125 \times 10^6/\text{cm}^2$ $1,04 \times 10^6/\text{cm}^2$	Tous les 2 jours pendant 7 jours, puis 2X par semaine A J4, cellules non adhérentes réensemencées sur gélatine.	Tura 2010
PB-MNC	gelatine 0,2%	M199 supplémenté	-	Même opération 1X/semaine pendant 2	Gill 2001
CD34+	gelatine 0,2%	EGM2	-	???	Bompais 2004
PB-MNC	gelatine 0,2%	EGM2	$1,04 \times 10^6/\text{cm}^2$	A J6 puis tous les 3 jours	Hur 2004
PB-MNC	gélatine 0,2%	EGM2	$0,52 \times 10^6/\text{cm}^2$	Tous les 4 jours	Güven 2006
PB ou BM-MNC	laminine	EGM2	$0,73 \times 10^6/\text{cm}^2$	-	Braunstein 2006

PB-MNC : peripheral blood mononuclear cells

BM-MNC : bone marrow mononuclear cells

UCB-MNC : umbilical cord blood mononuclear cells

mobPB-MNC : mobilized peripheral blood mononuclear cells

## 2.2 La cytométrie en flux

Cette technologie permet de sélectionner une population plus homogène. Elle doit cependant faire face à plusieurs difficultés citées précédemment: les PEC sont des événements rares et il n'existe pas de marqueur spécifique permettant de les différencier des CEC et CSH (Timmermans 2009), certains antigènes étant exprimés faiblement, comme le KDR, ou de manière continue comme le CD133. De nombreuses méthodologies ont été décrites afin de quantifier les PEC utilisant soit du sang total, soit des CMN, des combinaisons différentes d'anticorps, avec ou sans lyse des globules rouges, des réglages différents du cytomètre et de la stratégie d'analyse, et une expression différente des résultats (par CMN ou par ml de sang).

➤ **Les PEC sont CD34+KDR+**

Le choix des marqueurs de surface a en effet évolué continuellement selon les propriétés de différenciation endothéliale et vasculogénique décrites dans les études ciblant les différentes sous-populations. La première définition des PEC a été proposée par Asahara et al en 1997, basée sur l'expression du CD34 (Asahara 1997). En culture, les cellules CD34+ et les cellules flk-1 (VEGF-R2 ou KDR) isolées du sang périphérique par sélection immunomagnétique formaient des groupes de cellules rondes entourées de cellules à morphologie fusiforme, exprimant des marqueurs endothéliaux et incorporant la DiI-labeled acetylated low-density lipoprotein (acLDL). Elles étaient capables d'améliorer la circulation sanguine dans un modèle expérimental de patte ischémisée chez la souris. Le CD34 est cependant également exprimé par les CSH, d'où l'utilisation d'un marqueur endothélial spécifique conjointement, tel que la lectine UEA-1, le CD31 (PECAM1), le CD146, la VE-cadhérine, ou encore le VEGF-R2 (ou KDR). Ce marqueur est aussi exprimé par les CSH mais au stade précoce seulement, alors qu'il est présent à la surface des CE matures.

⇒ **phénotype CD34+KDR+**

*Mais pas de marqueur pour différencier des cellules matures.*

➤ **Ajout d'un marqueur pour différencier PEC et CEC**

L'étude de Peichev appuie l'utilisation combinée des marqueurs CD34+ et KDR, les cellules double-positives présentant des propriétés angiogéniques (Peichev 2000). Cette équipe a de plus proposé de cibler les cellules CD133+, cet antigène étant exprimé par 95% des CD34+KDR+ mais pas par les CE matures, permettant ainsi de les différencier des PEC. Il est à noter que le CD133 est aussi présent sur les CSH, et qu'aucun test clonogénique n'a été réalisé de manière directe avec les cellules CD133+ dans cette étude. cette combinaison a donc été proposée sur la base de l'expression du CD133 dans la population d'intérêt, les cellules CD34+KDR+. Reyes et al auraient montré des capacités angiogéniques des MAPC (multipotent adult progenitor cell) qui sont CD34-CD133+KDR+ (Reyes 2002).

⇒ **phénotype CD34+KDR+CD133+**

*Cette combinaison a été utilisée dans de nombreuses étude, mais :*



### ➤ **Données controversées concernant le CD133**

En 2007, deux équipes ont publié que les cellules souches CD133+ ne seraient pas à l'origine de la lignée endothéliale (Case 2007; Timmermans 2007) remettant en cause l'utilisation de cette combinaison de marqueurs pour identifier les PEC. Case et al ont en effet démontré que les cellules CD34+CD133+KDR+ étaient enrichies en cellules formant des colonies hématopoïétiques de faible et fort potentiel de prolifération (hematopoïetic LPP et HPP-CFC) mais ne conduisaient pas à la formation de colonies endothéliales, telles que les ECFC ni les CFU-EC. De plus, ces cellules ne formaient pas de capillaires en milieu Matrigel. Ils ont de plus démontré que seules les cellules CD34+CD45- pouvaient former des colonies d'ECFC. Ainsi, les cellules CD34+CD133+KDR+ et les cellules CD34+CD45+ seraient des sous-populations de cellules progénitrices hématopoïétiques et non des progéniteurs endothéliaux. De même, Timmermans et al ont montré que les cellules CD133+ formaient des colonies de PEC early mais pas de colonies d'ECFC et n'exprimaient ni le KDR, ni la VE-cadhérine mais le CD45. Seules les cellules CD34+CD45- engendraient la formation d'ECFC en culture. Ces cellules exprimaient le KDR mais pas le CD133. Ces observations sont cependant contradictoires avec l'étude de Gehling et al (Gehling 2000) qui a montré que les cellules CD133+, isolées de sang périphérique après mobilisation, se différenciaient en CE et s'incorporaient dans les vaisseaux lors de la croissance tumorale et la potentialisaient. Il a aussi été montré que, lors de leur émergence en culture, les PEC tardifs exprimaient des taux non négligeables d'ARNm de CD133 (Bompais 2004). Les cellules CD34+, CD34+CD133+ et CD34+KDR+CD133+ ne peuvent donc pas être assimilées à des PEC, mais juste à des cellules hématopoïétiques, qui, selon les conditions de culture, peuvent (ou pas) donner naissance à des PEC. Cette confusion entre les types cellulaires montre bien la nécessité de caractériser les cellules définies en cytométrie par un test fonctionnel, souvent non réalisé. Elle explique certainement en partie les données contradictoires rapportées dans certains domaines d'étude comme l'HTAP et le vieillissement, certains groupes ayant appelé PEC des cellules finalement hématopoïétiques. Il est toutefois possible que ces populations renferment un contingent très faible de réels progéniteurs endothéliaux, ce qui explique la difficulté de les isoler en culture à partir de sang adulte.

**⇒ Ne pas utiliser le CD133 pour quantifier les cellules qui génèrent des ECFC**

**⇒ phénotype CD34+KDR+CD45-**

*Ajouter un autre marqueur permettant de différencier les progéniteurs endothéliaux des CE matures*

➤ **ECFC, véritables progéniteurs endothéliaux, à l'inverse des CFU-EC**

Des cellules peuvent être définies comme des véritables progéniteurs si elles ont la capacité de générer des colonies de CE. Les capacités clonogéniques des CFU-EC et des ECFC ont été comparées (Yoder 2007). Aucune cellule dérivée des colonies de CFU-EC n'a pu former des colonies secondaires, contrairement aux ECFC dont 32% ont formé des colonies après 7 jours de culture. De plus, un modèle expérimental a été développé chez la souris SCID afin d'observer la formation de nouveaux vaisseaux dans des implants de collagène mélangé à des PEC (Yoder 2007). Seules les ECFC ont formé des vaisseaux dans ce modèle. Ainsi, les cellules circulantes qui génèrent des PEC précoces ne peuvent être considérés comme des vrais progéniteurs, et restent improprement nommées PEC. A l'inverse, la détection de certains marqueurs endothéliaux par les PEC précoces pourrait en fait être liée à une contamination par les plaquettes en culture (Prokopi 2009). Les monocytes pourraient en effet capter les microparticules plaquettaires à leur surface, celles-ci étant CD31+, FVW+ et lectine + et possédant des propriétés angiogéniques.

⇒ **Les CFU-EC sont en fait des cellules hématopoïétiques angiogéniques**

⇒ **Les ECFC sont des progéniteurs endothéliaux, à l'inverse des CFU-EC**

*mais pas de définition phénotypique des ECFC*

➤ **Propositions de technique de CF standardisée**

Au total, de nombreuses méthodes ont été mises au point afin de standardiser la quantification des PEC. Différentes stratégies ont été évoquées comme l'exclusion des événements CD3+ (marqueur lymphocytaire) et des agrégats de cellules (Shaffer 2006). La faible expression du KDR a été rapportée par plusieurs équipes, malgré l'utilisation d'anticorps différents (Werner 2007; Van Craenenbroeck 2008; Masouleh 2010). Un autre groupe l'a exclu de la combinaison de marqueurs, la titration de différents anticorps commercialisés n'étant pas réalisable (Estes 2010). Plus la concentration d'anticorps augmentait, plus il y avait de signal. Malgré les observations rapportées précédemment, une méthode de quantification basée sur le phénotype suivant CD45-CD31+CD133+ a été proposée (Masouleh 2010). En 2010, une équipe s'est basée sur les recommandations de

l'ISHAGE (International Society of Hematotherapy and Graft Engineering) utilisées pour la quantification des CSH dans les unités de thérapie cellulaire, et notamment sur la stratégie d'analyse, pour proposer une méthode de quantification des PEC basée sur l'expression du CD34, du KDR et la faible expression du CD45. Les résultats obtenus étaient corrélés à la quantification des PEC que ce soit par culture cellulaire (CAC) (Vasa 2001) ou par cytométrie (CD34+KDR+) lors d'études cliniques (Vasa 2001; Schmidt-Lucke 2005). Cependant, la définition des PEC avec cette technique se base sur une expression du CD45, bien que faible, supposant ainsi une origine hématopoïétique des cellules. Mais l'expression du CD45 par les PEC est toujours controversée. Zerbini et al ont en effet observé que la fraction CD45- n'était composée que de cellules mortes et de débris cellulaires, et soutenaient que les PEC étaient CD45dim (Zerbini 2008). Plusieurs précautions ont déjà permis d'améliorer la détection des PEC, comme l'utilisation d'anticorps bloquant, d'un marqueur de viabilité (Khan 2005) et d'un marqueur plaquettaire (McFarland 2006), l'enregistrement d'un grand nombre d'évènements (Schmidt-Lucke 2010).

#### ➤ **Identification des cellules formant des ECFC par CF**

Mais c'est l'application des recommandations d'utilisation de la cytométrie proposées lors du développement des marquages multi-couleurs qui a permis une avancée importante dans la quantification des PEC. En effet, L'analyse cytométrique des évènements rares requiert une combinaison d'anticorps optimale, un bon réglage des compensations et une sélection appropriée des graphes d'analyse afin d'éliminer les cellules autofluorescentes qui viendraient contaminer la population d'intérêt. Des améliorations ont été apportées par l'avancée des technologies en cytométrie, l'utilisation d'échelles bi-exponentielles et l'utilisation de contrôles "FMO" (fluorescence minus one) permettant la réalisation de méthodes de cytométrie en flux multi-couleurs optimales (PFC pour polychromatic flow cytometry) (Mahnke and Roederer 2007). La PFC permet d'améliorer la résolution pour les antigènes faiblement exprimés et d'éliminer les cellules responsables des faux positifs : les cellules monocytaires (CD14+), les cellules érythrocytaires (CD235a), les plaquettes (CD41a+) et les cellules mortes (LIVE/DEAD violet+). Par cette technique, Estes et al ont défini une population contenant des ECFC présentant le phénotype suivant : CD31+CD34<sup>fort</sup>CD45-AC133- CD14-CD41a-CD235a-LIVE/DEAD violet- (Estes 2010). Cette population ne pouvait pas être détectée par les méthodes de cytométrie conventionnelles. L'obtention de colonies d'ECFC à partir de ces cellules a été démontré par Mund et al (Mund 2012), observant aussi que cette population contenait également des CEC. Deux populations

de cellules hématopoïétiques ont également été identifiées : des progéniteurs pro-angiogéniques circulants (CD31+ CD34 bright CD45dim AC133+ CD14-) et des progéniteurs circulants non angiogéniques (CD31+ CD34 bright CD45dim AC133-). Les progéniteurs pro-angiogéniques circulants, aussi appelés CHSPC (circulating hematopoietic stem and progenitor cells), expriment aussi des marqueurs myéloïdes et ont des fonctions proangiogènes, mais pas d'activité vasculogénique (Estes 2010). Le ratio de ces deux populations hématopoïétiques, impossible à déterminer avec les techniques conventionnelles, serait un biomarqueur très intéressant. Hristov et al a également récemment proposé de quantifier les PEC sur la base de la combinaison classique : CD45dimCD34+KDR+, en appliquant des recommandations de la PFC (Hristov 2012).

⇒ **Quantification des ECFC avec la PFC**

⇒ **Ratio de progéniteurs hématopoïétiques pro-angiogéniques versus non-angiogéniques**

➤ **Proposition de nomenclature pour ce travail**

La nomenclature qui sera utilisée dans le reste de ce travail est la suivante :

**PEC précoces** : terme général pour parler des CFU-EC comme des CAC.

**ECFC** : correspond aux PEC tardifs

**Cellules progénitrices circulantes (CPC)** : cellules CD34+, CD133+ ou doublement positives

**Cellules souches hématopoïétiques (CSH)** : cellules CD34+CD45dim

**PEC** : on conservera ce terme pour les cellules CD34+KDR+CD133+, bien qu'il ait été démontré que ces cellules ne pouvaient donner que des colonies de PEC précoces et que le terme de cellules hématopoïétiques angiogéniques circulantes serait plus approprié.

## **2.3 Conclusion**

Au total, plus de 95% des CMN CD45+ sont des éléments hématopoïétiques. Une partie importante des cellules phagocytaires circulantes, environ 5% des CMN, a été appelée cellules angiogéniques circulantes puis PEC. Ces cellules représentent une population hétérogène de cellules myéloïdes différenciées. Une fraction plus petite d'environ 80 à 800 cellules/ml de sang adulte sont des progéniteurs hématopoïétiques CD45+. Le nombre de CFU-EC est équivalent à cette fraction. Les ECFC présentent des caractéristiques de

progéniteurs. On en trouve à une concentration de 2 à 5 cellules/ml dans le sang de cordon, et environ 0,05 à 0,2 cellules/ml dans le sang adulte (Ingram 2004) à différencier des CEC, présentes dans le sang adulte à raison de 3 cellules/ml (Woywodt 2006).

Étant donné l'utilité potentielle des PEC comme marqueurs cellulaires de cancer ou de pathologie cardiovasculaire, mais également comme produits de thérapie cellulaire, une meilleure caractérisation de ces cellules est nécessaire. Dans ce contexte, une expression sélective des bone morphogenetic proteins 2 et 4 (BMP2/4) (famille du TGF  $\beta$ ) dans les ECFC par comparaison aux PEC précoces a été montrée ainsi que le rôle angiogénique de ces molécules (Smadja 2008). Notre équipe a également décrit une différence d'expression de l'IL-8, importante à l'état basal dans les CFU-EC isolés de sang adulte, contrairement aux ECFC (Smadja 2008). Les récepteurs CXCR1 et CXCR2 sont également très exprimés dans les CFU-EC. D'autre part, la qualification de PEC des populations cellulaires identifiées par cytométrie devrait être validée par une caractérisation fonctionnelle (morphologie cellulaire, test clonogénique) avant de tester leur rôle dans des modèles *in vitro* ou *in vivo* (Yoder and Ingram 2009). Ingram et al ont développé en 2004 un test clonogénique pour quantifier le potentiel prolifératif des CE dérivées des PEC de sang de cordon et de sang adulte (Ingram 2004). Déterminer si une cellule est capable de se diviser et de former des colonies en l'absence d'autres cellules est le test le plus rigoureux pour définir une cellule progénitrice. Elle est réalisée par un essai clonogénique avec une seule cellule : les conditions doivent être bien définies. Les limites de cette méthode sont entre autres un problème de reproductibilité et l'absence de la coopération avec d'autres types cellulaires qui peut être nécessaire pour leur activité.

La quantification des ECFC est plus difficile à mettre en oeuvre pour les larges cohortes car elle demande des protocoles longs de culture et un grand volume de sang en raison de leur faible fréquence. Le développement récent d'une méthode de quantification des ECFC par cytométrie en flux permettra probablement une plus grande étude de cette sous-population (Estes 2010). Actuellement, l'absence de corrélation entre ces différents tests (Powell 2005; Van Craenenbroeck 2008; Povsic 2009), en lien avec l'hétérogénéité des sous-populations de PEC dénombrées, reste une source de discordance possible entre les études publiées et justifie la poursuite d'un travail de standardisation méthodologique, ce qui fait l'objet d'une partie du travail de cette thèse.

### 3) Origine des PEC

#### 3.1 Théorie de l'hémangioblaste

Les cellules immatures des lignées hématopoïétique et endothéliale partagent des antigènes de surface comme le CD34, le KDR ou le CD133 (Asahara 1997; Gehling 2000; Peichev 2000). De plus, plusieurs études ont montré une origine médullaire des PEC. Un modèle *in vivo*, de greffe de moelle osseuse chez un chien porteur d'une endoprothèse aortique, a montré que des cellules CD34+ provenant du donneur étaient présentes dans la circulation et avaient colonisé la prothèse (Shi 1998). Dans une autre étude, des souris irradiées ont été greffées avec la moelle de souris transgéniques. Chez ces souris, l'expression du gène Lac-Z est sous le contrôle de promoteurs de gènes spécifiques de la lignée endothéliale. Les cellules du donneur, colorées par ajout de la  $\beta$ -galactosidase, ont ainsi été observées au niveau des foyers de néoangiogenèse (Asahara 1999). L'origine médullaire des progéniteurs endothéliaux a également été observée chez l'homme. Une étude a été réalisée chez des patients ayant reçu une greffe de CSH d'un donneur du sexe opposé (Lin 2000). Les ECFC isolés chez les receveurs avaient le génotype du donneur, appuyant ainsi l'origine médullaire d'angioblastes circulants formant des ECFC en culture. L'absence d'ECFC provenant du donneur n'excluait pas l'existence d'une autre origine, les donneurs ayant reçu une chimiothérapie intensive avant la transplantation. De même, des greffes de MO avec des donneurs de sexe opposé ont permis de montrer la présence de CE du donneur dans les vaisseaux du receveur (Jiang 2004). De plus, le transcrit de fusion *BCR-ABL* a été retrouvé dans quelques CE de patients atteints de leucémie myéloïde chronique (Gunsilius 2000), ainsi que la mutation *JAK2 V617F* dans une partie des PEC précoces des patients avec une maladie de Vaquez (Oppliger Leibundgut 2006).

Ces arguments sont en faveur de l'existence d'un précurseur commun aux lignées hématopoïétique et endothéliale : l'hémangioblaste, également retrouvé dans le sang de cordon (Pelosi 2002). Cette cellule exprime le CD34 et le KDR et peut former des colonies endothéliales et hématopoïétiques. La présence de CSH dans le plancher ventral de l'aorte dorsale, à l'intérieur de la région AGM appuie cette théorie. De plus, plusieurs études ont montré que les CSH dérivées de la MO contenaient une sous-population de cellules pouvant donner des PEC (Grant 2002; Bailey 2004). L'existence d'un endothélium hémogénique a été démontré en 2004 avec la description de CE, dérivées des cellules souches embryonnaires humaines, capables de former des cellules endothéliales et hématopoïétiques en culture. Des

cellules avec le même potentiel ont été décrites dans le sang de cordon, faisant émerger l'hypothèse d'un endothélium hémogénique chez l'adulte (Wu 2007). Cette hypothèse serait en fait reliée avec celle de l'existence postnatale d'un hémangioblaste. Une étude a en effet montré que ce dernier serait à l'origine de la formation d'un endothélium hémogénique Tie-2+ cKit+ CD41-, dont dériveraient les cellules hématopoïétiques CD41+ (Lancrin 2009). Ceci n'exclut pas la présence de d'autres sources de PEC comme les cellules souches mésenchymateuses ou même des cellules souches résidentes dans les tissus.

### 3.2 Origine monocyttaire des CFU-EC

Une étude a comparé la présence de la mutation *JAK2 V617F* dans les PEC précoces et les ECFC de 11 patients. La mutation était présente dans les PEC précoces de tous les patients, mais seulement dans 3% des colonies d'ECFC, provenant toutes du même patient. Ces résultats montrent que les deux types de PEC ont des origines cellulaires différentes. L'origine des ECFC n'est pas clairement établie, elles pourraient dériver des CE matures ou des cellules souches résidentes des vaisseaux sanguins (Yoder 2007), ce que confirme l'absence de la mutation *bcr-abl* dans les ECFC isolés de patients atteints de leucémie myéloïde chronique (Piaggio 2009). Concernant les PEC précoces, plusieurs études ont démontré leur origine monocyttaire, sur la base de l'expression du CD14 et du CD45. Les expériences de Gulati et al ont montré que la différence d'expression du marqueur monocyttaire CD14 entre les deux populations de PEC ne vient pas d'une perte d'expression lors de la différenciation en PEC tardifs, mais est liée à une origine différente (Gulati 2003). En effet, seules les cellules isolées du sang périphérique CD14- peuvent former des colonies de ECFC en culture. Les PEC précoces présentent même certaines propriétés monocytaires comme la phagocytose d'*Escherichia coli*. Elles ne peuvent donner de colonies endothéliales secondaires mais un faible pourcentage forment des CFU-GM. De même, Sharpe et al ont montré que les CMN du sang périphérique formaient autant de PEC précoces que celles de la MO et les cellules CD34- (Sharpe 2006), et que seules les cellules CD14+ pouvaient en générer. Ces PEC précoces dérivant de la lignée monocyttaire sont générés par les cellules exprimant encore le CD31, soit les précurseurs myéloïdes et les monocytes, mais pas les macrophages ni les CSH (**Figure 8**). Les monocytes matures présentent les mêmes caractéristiques phénotypiques que les PEC et peuvent former des réseaux vasculaires, ne pouvant ainsi être distingués des PEC dans les modèles expérimentaux (Rohde 2006). Il a également été montré que des cellules CD3+ CD31+ CXCR4+ constituaient le centre des

colonies de CFU-EC, aussi nommées cellules T angiogéniques (Hur 2007). Elles sont nécessaires à la formation et la différenciation des CFU-EC, sécrètent de nombreuses cytokines angiogéniques dont le VEGF et l'IL-8, amplifient la prolifération des CE et leurs fonctions et participent à la formation des vaisseaux. Leur nombre est corrélé à celui des PEC et elles diminuent avec l'âge et un nombre élevé de FR de maladies coronariennes. De plus, seules les ECFC ont des propriétés de progéniteurs (Yoder 2007). L'avantage des PEC précoces est leur isolement par des anticorps et le probable potentiel vasculogénique et angiogénique des cellules primitives.

### **3.3 Origine extra-médullaire des PEC**

Ingram et al ont décrit la présence d'une hiérarchie complète de progéniteurs endothéliaux au sein des populations de CE vasculaires telles que les HUVEC (Human umbilical Vein endothelial cells) et les HAEC (human aortic endothelial cells) montrant ainsi qu'il y avait des progéniteurs endothéliaux résidents au niveau de l'intima des vaisseaux (environ 20%). Ces ECFC résidentes représentent probablement la source principale de CE lors de l'angiogenèse (Ingram 2005). Chez la souris, il a été montré que c'était surtout dans les microvaisseaux que les progéniteurs résidents étaient sélectionnés pour la néovascularisation (Risau and Flamme 1995). Mais il semble qu'ils ne soient pas la source principale dans les plus gros vaisseaux. Alvarez et al ont montré que les CE des microvaisseaux pulmonaires de rat contenaient une quantité importante de HPP-ECFC, montrant l'existence de progéniteurs endothéliaux microvasculaires résidents qui conservent leur spécificité fonctionnelle de cellules microvasculaires (Alvarez 2008). Les CE d'artère pulmonaire de rat sont à l'inverse essentiellement différenciées. Il serait maintenant intéressant de voir comment ces cellules contribuent au renouvellement de l'endothélium pulmonaire physiologique et en réponse aux agressions. Chez l'homme, Zengin et al ont démontré la présence de progéniteurs endothéliaux résidents dans la paroi vasculaire humaine et leur localisation précise au niveau d'une zone dite "vasculogénique" située entre la couche de CML et l'adventice, en bordure de la limitante élastique interne (Zengin 2006). Ces cellules CD34+ CD31- KDR+ et Tie-2+ ont la capacité de former des pseudotubes *in vitro*. Des CE CD31+CD45- ont été identifiées parmi les side-population (SP) stem cells à la surface interne de l'endothélium (caractérisées par leur capacité d'efflux). Elles sont détectées dans de nombreux organes mais pas dans tous, comme par exemple cerveau, le sang périphérique et la moelle osseuse. Elles résident surtout dans les veines et les capillaires mais pas dans les vaisseaux lymphatiques. L'ischémie induit



un plus grand nombre de EC-SP à 3 jours ainsi que leur prolifération alors que les cellules sont quiescentes à l'état basal (Naito 2011).

Par ailleurs, d'autres tissus comme le coeur, le cerveau, l'intestin, le foie, le tissu adipeux et la paroi vasculaire semblent également constituer des réservoirs de cellules souches/progénitrices présentant un potentiel vasculogénique (Planat-Benard 2004; Aicher 2007; Carriere 2009; Li 2012; Makkar 2012). L'équipe de Aicher a montré dans un modèle de parabiose une participation prédominante à la revascularisation post-ischémique de cellules souches non dérivées de la moelle osseuse mais des tissus comme le foie ou les intestins (Aicher 2007).

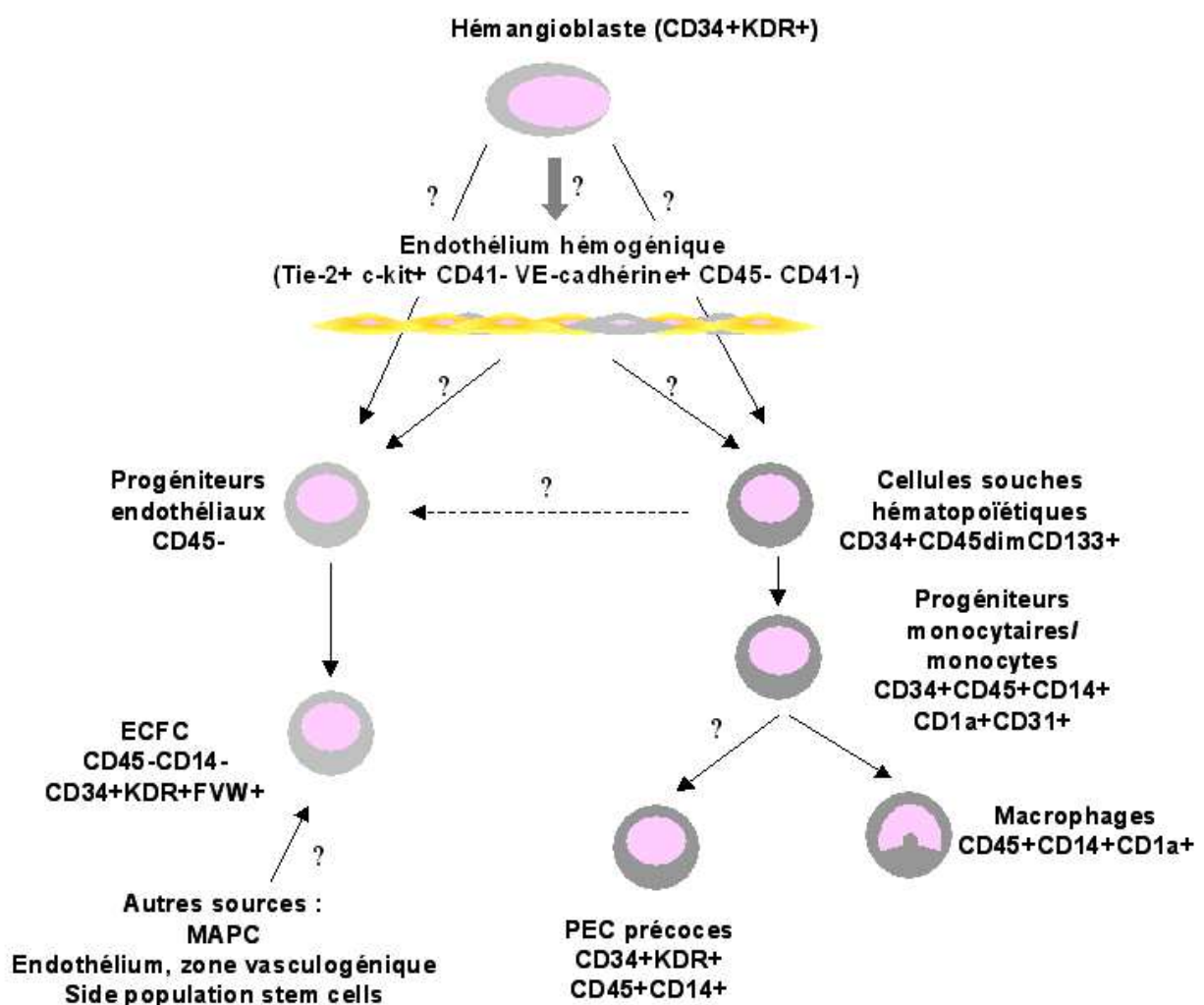


Figure 8 : Voies de différenciation hypothétiques des PEC

### **III.3 Applications cliniques**

Compte tenu des précisions apportées précédemment sur la définition et le phénotype des PEC, les résultats des études cliniques rapportées sont difficilement interprétables, parfois discordants en fonction des méthodes utilisées.

#### **1) PEC et facteurs de risque cardio-vasculaire**

Des études cliniques ont montré que le nombre de PEC circulants était inversement corrélé aux facteurs de risque (FR) classiques d'athérosclérose (Vasa 2001; Hill 2003). De plus, la capacité migratoire des PEC précoces chez les patients coronariens est inversement corrélée avec le nombre de FR cardiovasculaires (Vasa 2001). Une diminution du taux voir de la fonctionnalité des PEC a été décrite dans plusieurs conditions représentant un FRCV. Les diabètes de type 1 et 2 ont des effets néfastes sur le nombre (Fadini 2005) et la fonctionnalité des PEC (Tepper 2002; Loomans 2004). Dans ce contexte, les effets néfastes de l'hyperglycémie ont été attribués à une diminution de la production de NO et donc d'activité de la MMP-9 (Krankel 2005). D'autre part, une diminution de la mobilisation des PEC médullaires dans la circulation a été observée dans un modèle expérimental d'ischémie de la patte chez la souris diabétique (Tamarat 2004). Un des principaux FR cardiovasculaire est la dyslipidémie, soit l'augmentation de la concentration d'une fraction lipidique, le LDL-C (low density lipoprotein cholesterol). Le taux de cholestérol total et de LDL est inversement corrélé au nombre et aux fonctions des PEC (Imanishi 2003; Chen 2004; Imanishi 2004; Wang 2004). Les LDL oxydés seraient capables d'induire l'apoptose de ces cellules (Imanishi 2004). Les effets du LDL-C sur la sénescence des PEC pourraient être contrebalancés par l'utilisation des statines (Dimmeler 2001). Le syndrome métabolique (Fadini 2009), comme l'hypertension réfractaire (Oliveras 2008) et l'insuffisance rénale chronique (Jie 2010) sont également associés à une diminution des PEC. Plusieurs études ont montré une corrélation entre leur nombre et des marqueurs du stade de l'insuffisance rénale (Chan 2005; de Groot 2005; Schlieper 2008), ainsi qu'avec une récupération de leurs fonctions avec l'hémodialyse (Chan 2005). Le tabagisme est un FR cardiovasculaire important qui a été associé à une diminution du nombre de PEC (Vasa 2001). L'altération fonctionnelle des PEC associée au tabagisme serait liée à une augmentation du stress oxydatif (Michaud 2006). Leur taux remonte après arrêt du tabac en moins de quatre semaines (Kondo 2004). Le vieillissement a aussi été associé à une diminution du nombre et des propriétés des PEC (Tao 2006), malgré des discordances. Ce sujet est abordé plus en détails dans la partie consacrée au vieillissement endothélial. Il

semblerait que le genre influence également le taux de PEC (Fadini 2008), en lien avec l'effet des estrogènes (Strehlow 2003).

## **2) PEC et pathologies cardio-vasculaires**

Les pathologies cardiovasculaires ont également été associées à un nombre et à une fonctionnalité des PEC précoces diminués, notamment chez les patients coronariens (Vasa 2001; Hill 2003; Scheubel 2003; Fadini 2005; Heiss 2005; Thum 2005). La seule étude ayant exploré le taux d'ECFC chez ces patients a montré au contraire une augmentation corrélée au degré de sténose coronaire (Güven 2006). Les PEC sont également diminués dans l'insuffisance cardiaque congestive (Valgimigli 2004) et dans la resténose de stent (George 2003).

A l'inverse, une augmentation des PEC a été rapportée dans des situations d'ischémie aiguë, telles que l'infarctus du myocarde (Lev 2005; Massa 2005) et dans les 7 jours suivant une crise cardiaque (Shintani 2001), l'angor instable (George 2004) et l'accident vasculaire cérébral (Sobrino 2007), en association avec un pronostic plus favorable. Cette mobilisation a été confirmée pour les ECFC avec une augmentation à la phase aiguë de l'IDM (Massa 2009), et l'association entre le taux d'ECFC et une taille réduite d'infarctus (Meneveau 2011).

Au total, on observe une diminution des PEC chez les patients présentant un risque cardiovasculaire, et une augmentation lors d'un événement cardiovasculaire sévère. Ces cellules présenteraient donc un effet protecteur contre le développement de certaines pathologies du système CV. Le taux de PEC est un meilleur facteur prédictif de dysfonction endothéliale que les FR habituels (Hill 2003). Une étude réalisée dans un petit groupe de patients coronariens a montré que le taux de PEC à l'inclusion des patients était un facteur prédictif indépendant de survenue d'évènement cardiovasculaire (Schmidt-Lucke 2005). Werner et al (Werner 2005) ont montré que la période sans événements cardiovasculaires cumulés était corrélée au taux de PEC circulants CD34+/KDR+, à la mortalité cardiovasculaire et à la date du premier événement cardiovasculaire. Une analyse groupée de quatre études longitudinales a montré que les cellules CD34+ seules suffiraient en terme d'outil pronostique (Fadini 2010).

### **3) PEC et autres pathologies**

Des altérations du nombre et/ou de la fonctionnalité des PEC ont également été décrites dans les bronchopneumopathies obstructives chroniques (Palange 2006), la polyarthrite rhumatoïde (Grisar 2005) et les maladies rhumatismales en général (Westerweel and Verhaar 2009). Une augmentation des PEC a été observée lors des phases d'exacerbations des BPCO (Sala 2010). Les résultats obtenus dans l'hypertension pulmonaire sont controversés, certains ayant décrit une diminution des PEC voire une dysfonction (Diller 2008), d'autre une augmentation (Asosingh 2008). Ce point sera discuté dans la partie traitant l'hypertension pulmonaire (HTP). Une augmentation des PEC a été rapportée par ailleurs dans les pathologies tumorales, telles que le cancer du sein (Naik 2008) ou le lymphome (Igreja 2007), en corrélation avec le grade de la tumeur. Le nombre de PEC serait aussi un indicateur de réponse aux traitements comme la chimiothérapie et les traitements anti-angiogéniques (Shaked 2006).

### **4) Conclusion**

Quelques études ont montré une corrélation entre le nombre de PECs, la sévérité de la dysfonction endothéliale mesurée de façon invasive ou non, et l'évolution des patients (Werner 2007). Dans différents contextes tels que le vieillissement, l'activité des PEC est corrélée à l'intégrité fonctionnelle de l'endothélium évaluée par la mesure de la dilatation dépendante de l'endothélium (Murphy 2007). D'autres n'ont pu démontrer de lien entre les PEC et la fonction endothéliale (Desai 2009; Jung 2010).

## **III.4 Applications thérapeutiques**

Au-delà de leur intérêt comme marqueur potentiel du risque cardiovasculaire cumulé, l'étude des PEC se justifie également dans le cadre du développement d'un produit de thérapie cellulaire (PTC).

### **1) Preuve de concept chez l'animal**

L'existence des PEC dans le sang périphérique de l'homme adulte a rapidement suscité des perspectives en thérapie cellulaire. En effet, la preuve du concept réalisée dans un premier temps chez le petit animal a permis de valider l'efficacité de ces cellules. Il est à noter que les PEC précoces et les ECFC ont un effet similaire et synergique dans ces modèles (Hur 2004;

Yoon 2005). Les PEC humains, qu'ils soient injectés après expansion en culture ou juste après isolement, ont un potentiel thérapeutique dans les maladies des artères périphériques et coronariennes (Asahara and Kawamoto 2004). Le potentiel thérapeutique des PEC humains isolés du sang périphérique en culture a été démontré pour la première fois chez la souris nude par une amélioration de la perfusion du membre ischémié après la greffe de ces cellules ainsi qu'une diminution du taux d'amputation et de nécrose, en comparaison à l'administration de CE microvasculaires ou d'un milieu de contrôle (Kalka 2000). La même stratégie a été appliquée dans un modèle d'ischémie myocardique chez le rat nude, montrant une incorporation des PEC humains dans les nouveaux vaisseaux myocardiques et leur différenciation en cellules matures, avec un effet protecteur de la fonction ventriculaire gauche et une inhibition de la fibrose myocardique (Kawamoto 2001). D'autres équipes ont injecté des cellules mononucléées CD34+ non cultivées, soit une fraction enrichie en PEC. Ces cellules injectées localement ont permis une restauration significative du flux sanguin au niveau du membre ischémié dans des modèles de souris nude diabétiques (Schattelman 2000). Injectées en intraveineuse chez des rats nude avec ischémie myocardique, elles avaient un effet protecteur sur la fonction ventriculaire gauche avec une inhibition de l'apoptose des cardiomyocytes (Kocher 2001). Une autre étude a montré que la contribution des cellules CD34+ à la récupération de la fonction ventriculaire gauche et à la néovascularisation du myocarde ischémié était dose-dépendante (Iwasaki 2006).

## **2) Développement d'un produit de thérapie cellulaire**

Plusieurs problèmes sont rencontrés dans le développement d'un produit de thérapie cellulaire (PTC) à partir des PEC : le type cellulaire utilisé et la source, ainsi que la faible quantité de PEC dans le sang adulte, combinée à l'atteinte de l'endothélium avec les FRCV.

### **2.1 Type et source de cellules**

Les essais de thérapie cellulaire ont utilisé plusieurs sources de progéniteurs : des CMN isolées de la MO, des produits de cytophérèse, des cellules triées CD133+ ou CD34+ du sang périphérique, des PEC précoces après culture de CMN dérivés de la MO etc.

#### **➤ ECFC versus PEC précoces**

À l'issue de l'observation des effets bénéfiques retrouvés dans ces essais précliniques et cliniques, une abondante littérature est parue au cours de ces dernières années afin de tenter

d'expliquer les rôles respectifs de ces deux types de PEC, et de mieux connaître leurs propriétés fonctionnelles respectives. Tous deux participent à l'angiogenèse mais par des mécanismes différents qui leur confèrent des rôles thérapeutiques spécifiques. Les PEC précoces, agissant de manière paracrine, pourraient être utilisés pour augmenter la libération de facteurs angiogéniques localement. Les ECFC, définis comme véritables progéniteurs suscite un intérêt grandissant en termes d'outil thérapeutique. Une néovascularisation a été observée dans des spécimens d'amputation de patients présentant une ischémie critique de jambe et ayant reçu une injection locale de cellules mononucléées autologues de moelle osseuse (Duong Van Huyen 2008). La forte positivité pour BMP2/4 des CE constituant les néovaisseaux suggère que les cellules impliquées dans la néovascularisation aient un phénotype endothélial correspondant à celui des ECFC (Smadja 2008) et permet d'exclure l'hypothèse de l'incorporation de PEC précoces au néovaisseau. Le potentiel de prolifération élevé des ECFC permet leur expansion *ex vivo*. Cependant, ces cellules sont rares dans le sang périphérique et leur isolement nécessite une étape de culture de plusieurs semaines, limitant ainsi leur utilisation dans les contextes d'ischémie récente, pour lesquels la fenêtre thérapeutique n'est pas très large. L'optimisation de l'obtention des ECFC en culture est donc nécessaire pour pouvoir tester ces cellules dans des essais cliniques.

### ➤ Sang de cordon versus sang périphérique

Plusieurs arguments sont en faveur de l'utilisation du sang de cordon. Les PEC circulent en effet en faible nombre dans le sang périphérique, nécessitant une étape d'enrichissement. De plus, une hiérarchie dans les capacités de prolifération des progéniteurs entre le sang adulte et le sang de cordon a été décrite par Ingram (Ingram 2004). Les PEC dérivés du sang de cordon apparaissent plus tôt en culture, donnent des colonies plus larges et plus de colonies. Leur vitesse de croissance est plus importante et elles contiennent des HPP-ECFC, contrairement aux PEC dérivés du sang périphérique pour qui le stade de LPP-ECFC est le stade le plus prolifératif détecté. Cette hiérarchie a été observée également lors de l'activation du récepteur à la thrombine PAR-1, où l'induction de la prolifération est beaucoup moins importante avec les ECFC dérivées du sang périphérique qu'avec celles dérivées du sang de cordon (Smadja 2006). Seules les ECFC dérivées du sang de cordon permettent la formation de vaisseaux durables *in vivo* comparés à celles du sang adulte (Au 2008). La plus forte expression d'ARNm pour des marqueurs de prolifération, tels que le Ki-67, la survivine et des molécules impliquées dans le cycle cellulaire, par les ECFC de cordon concorde avec les observations précédentes (Smadja 2009) (**Annexe 1**). D'autre part, les ECFC isolées

classiquement du sang adulte ne résistent pas à la congélation (Shepherd 2006), contrairement à celles isolées du sang de cordon (Vanneaux 2010).

Mais le sang de cordon est un produit allogénique, bien que moins immunogène que les cellules de MO ou de cytophère. L'utilisation des ECFC de sang adulte autologue nécessite donc d'avoir recours à des stratégies de mobilisation ou d'expansion *ex vivo*. Une technique récemment publiée d'expansion des ECFC à large échelle pourrait faciliter leur utilisation car elle permet d'obtenir une quantité importante de cellules qui peuvent être cryopréservées (Reinisch 2009).

### ➤ Origine extra-médullaire des ECFC

Plusieurs études ont démontré l'existence de progéniteurs endothéliaux au sein de la paroi vasculaire jusqu'au stade des HPP-ECFC (Ingram 2005), pouvant représenter une nouvelle source d'ECFC (cf § III.2.3 Origine des PEC).

## 2.2 Méthodes d'isolement/obtention des PEC

Les études réalisées chez l'animal suggèrent que la quantité de PEC hétérologues injectées par voie systémique doit être de 0,5 à  $2 \cdot 10^4$  PEC humains par gramme d'animal receveur pour avoir un résultat satisfaisant dans les modèles d'ischémie du membre (Asahara 1999; Kalka 2000; Kawamoto 2001; Iwasaki 2006). En moyenne, la quantité de PEC isolés en culture chez des volontaires sains atteint  $5 \cdot 10^6$  cellules pour 100 mL de sang périphérique au 7<sup>ème</sup> jour. Ainsi un volume sanguin de 12 litres serait nécessaire pour avoir suffisamment de PEC pour le traitement de l'ischémie critique du membre inférieur. Un autre facteur limitant pour l'utilisation des PEC en thérapie cellulaire est le fait que les patients nécessitant ces traitements présentent des conditions physiologiques ou pathologiques elles-mêmes associées à une diminution du nombre de PEC ou de leurs fonctions. Ainsi, plusieurs stratégies ont été envisagées pour optimiser le recueil de PEC en vue de leur utilisation comme PTC : la mobilisation des cellules à partir de la MO, l'expansion *ex vivo* ou la thérapie génique.

### ➤ Mobilisation des PEC

#### **Mobilisation par administration de facteurs exogènes :**

Cette stratégie permettrait d'améliorer la récupération après un événement ischémique et de compenser la dysfonction endothéliale éventuelle.

Le VEGF qui est le facteur critique de la vasculogénèse et de l'angiogénèse intervient dans la mobilisation des PEC à partir de la moelle osseuse, comme démontré chez la souris (Asahara 1999) ou chez l'homme après transfert du gène du VEGF dans l'ischémie critique du membre et l'infarctus du myocarde (Kalka 2000). Des modulations similaires de la cinétique des PEC ont été observées avec l'Ang-1 et VEGF injecté dans l'article, mobilisation plus tardive par Ang-1, et splénomégalie après épuisement de la MO) (Hattori 2001) et le SDF-1 (stromal-derived factor-1).

Le GM-CSF (Granulocyte Macrophage colony-stimulating factor) a un potentiel stimulant sur la mobilisation des PEC à partir de la moelle osseuse, leur incorporation au niveau des sites de néovascularisation, et leur prolifération et différenciation en culture (Takahashi 1999). Certains composés agissent principalement par inhibition directe (AMD-3100) (Liles 2003) ou indirecte (G-CSF) (Anderlini and Champlin 2008) de la liaison CXCR4/SDF-1 à l'origine de la rétention médullaire des progéniteurs. Le G-CSF est utilisé pour mobiliser les CSH en vue d'une greffe et dans les cas de neutropénies. Il active la différenciation en polynucléaires neutrophiles et le relargage de leur contenu enzymatique dont l'élastase. Celle-ci dégrade le SDF-1 mais aussi VCAM-1 exprimé sur les cellules stromales, qui se lie à l'intégrine  $\alpha 4$  des cellules progénitrices. Mais l'utilisation du G-CSF est controversée. Une méta-analyse effectuée en 2008 a conclu à l'absence de bénéfice clinique du G-CSF seul (Ripa and Kastrup 2008). Une autre méta-analyse a comparé l'utilisation de CMN dérivées de sang périphérique après mobilisation par du G-CSF à celles dérivées de la MO montrant une réduction de la douleur plus importante mais une moins bonne guérison des ulcères (Fadini 2010). D'autre part, après avoir constaté une très faible concentration en CFU-Hill dans le sang mobilisé avec du G-CSF comparé au sang normal (Tura 2007), Tura et al ont étudié les effets de cette molécule sur les propriétés angiogéniques des PEC (Tura 2010). Les cellules CD34+CD133-, contenant les précurseurs des ECFC, n'étaient pas mobilisées par le G-CSF et aucune colonie d'ECFC n'a été obtenue à partir du sang mobilisé. L'administration exogène du G-CSF inhibait la formation de CFU-EC et les propriétés angiogéniques des ECFC *in vitro* et *in vivo*. Les effets bénéfiques du G-CSF pourrait alors être liés à la mobilisation des CSH, migrant au niveau des lésions ischémiques et exerçant un effet paracrine sans incorporation dans les vaisseaux. A cela s'ajoutent des effets négatifs de l'administration de G-CSF, tels que l'induction d'infarctus et de resténoses après intervention post-infarctus (Kang 2004). De plus il favoriserait la croissance tumorale (Natori 2002) et doublerait le risque de leucémie myéloïde chronique et de syndromes myélodysplasiques chez



les femmes recevant une chimiothérapie dans le cancer du sein (Hershman 2007). Concernant l'AMD3100, une injection unique de cette molécule semble préserver la fonction cardiaque après un IDM en augmentant le nombre de PEC, par l'intermédiaire de l'expression de la MMP-9 au niveau de la moelle osseuse (Jujo 2010).

L'érythropoïétine induit la mobilisation des PEC chez la souris (Heeschen 2003) et chez l'homme (Bahlmann 2004). La modulation de l'hormone de croissance (GH, growth hormone) et de l'IGF-1 (Insulin-like growth factor) pourrait être utilisée en thérapie cellulaire dans la prévention des modifications du système CV associées à l'âge (Devin and Young 2008).

Les inhibiteurs de l'HMG-CoA réductase, les statines, ont été les premières molécules publiées ayant la capacité de mobiliser les PEC chez des patients coronariens ainsi que dans des modèles expérimentaux (Dimmeler 2001; Vasa 2001). Cela s'accompagne d'une augmentation des capacités migratoires des PEC *in vitro* et *in vivo*, dépendante de la voie PI3-kinase-Akt (Dimmeler 2001) et de l'activation de la NO synthase endothéliale (eNOS) (Landmesser 2004). Deschaseaux et al ont montré que des ECFC avaient été isolées seulement chez les patients traités par statine (Deschaseaux 2007).

### **Mobilisation par l'exercice :**

L'inactivité physique a été associée à une plus grande fréquence de maladies cardiovasculaires, mais également à une augmentation du stress oxydatif, de l'athérosclérose et des dysfonctions endothéliales (Laufs 2005). Plusieurs études suggèrent que l'exercice physique augmente le taux de PEC chez la souris et chez l'homme (Laufs 2004; Morici 2005; Steiner 2005; Hoetzer 2007). La mobilisation induite par un exercice intense serait un mécanisme d'adaptation et de réparation physiologique. Cependant, d'autres études montrent que la mobilisation dépend de la durée et de l'intensité de l'exercice (Laufs 2005; Thijssen 2006). Une augmentation du nombre de PEC n'a par ailleurs été rapportée que chez les patients qui avaient une ischémie symptomatique pendant l'exercice (Sandri 2005) ou des formes ischémiques de CAD (Adams 2004). Le stimulus ischémique semble donc être à l'origine de la mobilisation des PEC. Dans les modèles animaux, il y a une corrélation entre le taux de VEGF en période ischémique et la quantité de PEC (Asahara 1997; Asahara 1999). L'augmentation de la biodisponibilité du NO par un exercice intense pourrait être un mécanisme potentiel de régulation de la mobilisation des PEC. Aucune mobilisation des PEC n'est observée chez les souris KO pour la NOS ou lors de l'utilisation d'un inhibiteur de la

NOS chez des souris saines (Laufs 2004), mais le NO n'interviendrait pas dans la mobilisation des CSH (Ozuyaman 2005).

### ➤ **Expansion des PEC *ex vivo***

#### **Isolement par culture**

L'injection de PEC précoces obtenus par culture cellulaire a conduit à un effet bénéfique après application thérapeutique. Dans l'étude de Kawamoto et al, l'injection de PEC dérivés des CMN du sang périphérique après 7 jours de culture a conduit à une amélioration de la fonction ventriculaire gauche avec une meilleure densité capillaire dans un modèle d'infarctus du myocarde chez le rat (Kawamoto 2001). L'équipe de Ott et al a utilisé des cellules CD34+ isolées de sang périphérique après mobilisation par du G-CSF après 16 doublements de population, et des CD34+ isolées du sang de cordon après 46 doublements de population (Ott 2005). *In vivo*, ces cellules prolifèrent, forment des structures vasculaires et améliore la fonction ventriculaire gauche dans un modèle d'infarctus du myocarde.

#### **Expansion *ex vivo***

Les ECFC, contrairement aux PEC précoces, peuvent proliférer permettant d'envisager leur expansion avant utilisation. Cependant, les méthodes de culture classiquement utilisées (cf § identification des PEC par culture cellulaire) conduisent à la formation d'un nombre faible de colonies, comme l'a montré l'équipe de Yoder avec une moyenne de 0,017 colonies par  $10^6$  CMN. Une technique d'expansion cellulaire a été développée récemment permettant d'obtenir jusqu'à 150 millions de cellules après un seul passage, résistantes à la cryoconservation (Reinisch 2009). L'amélioration du rendement en ECFC (4 colonies/ml contre moins de 1 avec les techniques classiques) s'explique d'une part par la non manipulation du sang et le remplacement du sérum de veau fœtal par un pool de lysats plaquettaires d'origine humaine, apportant ainsi les facteurs de croissance et molécules angiogènes contenus dans les granules plaquettaires. Aucune matrice n'étant utilisée pour l'expansion, aucun produit d'origine animale n'est utilisé, permettant ainsi une application en clinique.

#### **Conditionnement *ex vivo***

Une autre stratégie de développement d'un produit de thérapie cellulaire serait d'augmenter les propriétés angiogéniques des PEC par un conditionnement *ex vivo*. Ainsi, le traitement des PEC par le VEGF induit une augmentation de synthèse de l'intégrine  $\alpha 6$

(Smadja 2007). Le prétraitement des PEC avec du SDF-1 permettrait la surexpression des sous-unités  $\alpha 4$  et  $\alpha M$  impliquées dans le homing des cellules immatures vers le site d'ischémie, et renforce l'adhérence des PEC à l'endothélium mature (Zemani 2008). Des composés activateurs du NO induisent la différenciation de cellules souches en cellules hématopoïétiques et endothéliales, et pourraient être utilisés dans le prétraitement des cellules des patients présentant un infarctus du myocarde (Sasaki 2006). D'autres stratégies proposent l'utilisation de la E-sélectine soluble (Oh 2007), l'activation de l'éphrine B4 par le Fc-éphrine B2 (Foubert 2007), ou l'activation de la  $\beta 2$  intégrine (Chavakis 2005) par des anticorps, afin d'augmenter les propriétés angiogéniques des PEC. Une des pistes développées par notre groupe est l'activation du récepteur à la thrombine PAR-1 par le peptide SFLLRN. En effet, la sécrétion d'IL-8 par les ECFC, très faible en conditions basales, est fortement augmentée après activation du PAR-1 et induit la migration en chambre de Boyden des PEC précoces. Ces résultats suggèrent que ce processus pourrait participer à la coopération entre les deux types de progéniteurs pendant la néovascularisation, médiée par un effet paracrine (Smadja 2008). Le DKK-1, inhibiteur de Wnt (wingless) stimule l'activité ostéoclastique et augmente la cytokine RANKL, à l'origine d'une activation de la mobilisation des cellules souches et du processus angiogénique (Aicher 2008). Le traitement *ex vivo* des PEC par le DKK-1 recombinant, qui augmente le potentiel angiogénique des ECFC *in vivo* et *in vitro* (Smadja 2010) (**Annexe 2**), pourrait être envisagé.

Bien évidemment, ces procédés, s'ils devaient être utilisés en thérapie cellulaire, devront être développés dans des conditions de grade clinique.

### ➤ **Modification génétique des PECs**

On peut envisager la modification génétique de ces cellules dans le sens d'une surexpression des facteurs de croissance, une augmentation de l'activité de signalisation de la réponse angiogénique, et l'extension de la demi-vie des cellules, ou bien la correction de sa dysfonction. Dans une étude de Iwaguro (Iwaguro 2002), la transplantation de PEC allogéniques transduites avec un adénovirus codant le VEGF a amélioré la néovascularisation dans un modèle animal de membre ischémié, restauré le flux sanguin et diminué le taux d'amputation. De plus, la quantité de PEC transfectés utilisés était 30 fois inférieure à celle nécessaire pour observer une amélioration du taux de récupération avec des PEC non transfectés. Le transfert du gène du VEGF constitue donc une option pour faire face au

nombre limité de PEC autologues pouvant être isolés à partir du sang périphérique avant une expansion *ex vivo*.

### 3) Etudes cliniques chez l'homme

Depuis la mise en évidence de l'origine médullaire des PEC, des protocoles d'angiogenèse thérapeutique ont évalué l'intérêt de l'injection de CMN autologues d'origine médullaire dans l'ischémie critique, l'ischémie du myocarde et l'insuffisance cardiaque, afin de restaurer le flux sanguin et de limiter les lésions organiques. Bien que n'ayant pas répondu complètement aux attentes faisant suite aux résultats obtenus chez l'animal, une méta analyse a montré les bénéfices de la thérapie cellulaire chez les patients avec infarctus du myocarde (IDM) ou une artériopathie oblitérante des membres inférieurs (AOMI) (Fadini 2010).

#### ➤ AOMI

La première étude pilote chez l'homme a été réalisée par une équipe japonaise en 2002 à partir de CMN autologues médullaires réinjectées en intra-musculaire au niveau du membre ischémié (Tateishi-Yuyama 2002). Compte tenu des résultats très positifs obtenus, un second groupe de patients a été inclus afin de réaliser une étude randomisée. Celle-ci a montré pour la première fois l'efficacité et la sécurité de l'implantation de CMN médullaires dans l'ischémie critique. Depuis, de nombreuses études utilisant le même protocole ont confirmé la faisabilité de la thérapie cellulaire par CMN médullaires ou périphériques (**Tableau IV**). Dans notre expérience (PHRC OPTIPEC, investigateur principal : Joseph Emmerich), l'observation de pièces d'amputation de patients ayant reçu une injection locale de cellules médullaires a permis de mettre en évidence un processus actif de néovascularisation au niveau des points d'injection ou des extrémités ischémiques (Duong Van Huyen 2008; Smadja 2008). Des études pilotes et/ou de Phase I/II ont également été menées pour évaluer l'efficacité d'une injection intramusculaire de cellules souches mésenchymateuses chez des patients présentant une AOMI ou une maladie de Burger (Kim 2006; Lu 2011). Une étude récente a démontré pour la première fois la faisabilité d'une injection intra-artérielle de CMN médullaires dans l'AOMI (étude PROVASA (Walter 2011)). Les données provenant des essais cliniques publiés suggèrent que la preuve clinique est encore insuffisante en termes d'amélioration de l'index de pression systolique cheville/bras. L'angiogenèse thérapeutique représente un espoir thérapeutique pour les nombreux patients non revascularisables que ce soit par un traitement médicamenteux ou chirurgical. Des questions restent encore en suspens concernant le type

cellulaire à utiliser, la quantité, la voie d'injection et la fréquence ainsi que la possibilité d'une toxicité à long terme. L'étude française en cours de recrutement "Bone Marrow Autograft in Limb Ischemia" (BALI) devrait permettre de répondre à ces questions.

**Tableau IV : Principaux essais cliniques de thérapie cellulaire basés sur l'administration de CMN médullaires dans l'AOMI**

Indication	Administration	Type cellulaire	Références
AOMI, Buerger	intramusculaire	BM-MNC	Esato 2002
AOMI	intramusculaire	BM-MNC	Saigawa 2004
AOMI	intramusculaire	BM-MNC	Higashi 2004
Buerger, IC	intramusculaire	BM-MNC	Nizankowski 2005
AOMI, IC	intramusculaire	BM-MNC	Miyamoto 2006
Buerger	intramusculaire	BM-MNC	Durdu 2006
AOMI, IC	intramusculaire	BM-MNC	Bartsch 2006
IC, Buerger	intramusculaire	BM-MNC	Kajiguchi 2007
IC	intramusculaire	BM-MNC	Pignon 2007
AOMI, IC	intramusculaire	BM-MNC	Gu 2008
AOMI, IC	intramusculaire	BM-MNC	Chochola 2008
IC	intramusculaire	BM-MNC	Wester 2008
AOMI	intramusculaire (IM) vs IM+intraartérielle	BM-MNC	Van Tongeren 2008
IC	intramusculaire	BM-MNC	Duong-van-huyen 2008
AOMI	intramusculaire	BM-MNC	De Vriese 2008
AOMI, Buerger	intramusculaire	BM-MNC	Matoba 2008
IC	intramusculaire	BM-MNC	Amann 2009
IC	intramusculaire	BM-MNC	Franz 2009
IC	intramusculaire	BM-MNC	Prochazka 2009
IC	intra-artérielle	BM-MNC	Walter 2011
IC, Buerger	intramusculaire	BM-MNC	Idei 2011
Buerger	intramusculaire	deux injections de BM-MNC	Saito 2007
AOMI, IC	intramusculaire	deux injections de BM-MNC (45 jours d'intervalle)	Cobellis 2008
IC	intra-artérielle	PB-MNC après mobilisation par du G-CSF	Lenk 2005
AOMI, IC	intramusculaire	PB-MNC après mobilisation par du G-CSF	Kawamura 2005
Buerger, AOMI	intramusculaire	PB-MNC après mobilisation par du G-CSF	Ishida 2005
AOMI, Buerger	intramusculaire	PB-MNC après mobilisation par du G-CSF	Horie 2010
IC	intramusculaire	groupe A : BM-MNC groupe B : BM-MNC vs PB-MNC	Tateishi-Yuyama 2002
AOMI	intramusculaire	BM-MNC vs mobPB-MNC	Huang 2005
AOMI	intramusculaire	cellules CD133+ après mobilisation par du G-CSF	Canizo 2007
IC	intramusculaire	cellules CD133+ après mobilisation par du G-CSF	Burt 2010
IC	intramusculaire	cellules CD34+ après mobilisation par du G-CSF	Kudo 2003
IC	intramusculaire	cellules CD34+ après mobilisation par du G-CSF	Kawamoto 2009
IC	intramusculaire	BM-MNC + BM-MSC	Lasala 2010
IC	intramusculaire	BM-MNC vs BM-MSC	Lu 2011
IC	intra-artérielle	BM-MNC + antioxydants oraux et L-arginine	Napoli 2008
IC	intramusculaire	BM-MNC + produit de sécrétion de fibroblastes de derme	Mizuno 2010

BM-MNC : bone marrow mononuclear cells

PB-MNC : peripheral blood mononuclear cells

BM-MSC : bone marrow mesenchymal stem cells

## ➤ Pathologies cardiaques

L'objectif ici est de restaurer tout ou une partie des zones infarctées. Les trois principales indications de la thérapie cellulaire sont l'infarctus du myocarde (IDM), l'angor réfarctaire et l'insuffisance cardiaque (IC). Les principaux essais de thérapie cellulaire sont présentés dans le **tableau V**. Au-delà de leur intérêt comme marqueur potentiel du risque cardiovasculaire cumulé, l'étude des PEC se justifie également dans le cadre du développement d'un produit de thérapie cellulaire.

Dans *l'ischémie du myocarde*, plus de 20 essais sont publiés à ce jour, dont près de la moitié randomisés, qui ont montré un effet globalement positif (Martin-Rendon 2008). Les essais ont principalement utilisé des CMN médullaires, mais aussi des cellules triées CD34+ ou CD133+. Pour l'IC, les premières cellules testées ont été les précurseurs de cellules musculaires (myoblastes). Le tableau V reprend les principales études publiées dans les pathologies cardiaques. Certaines études n'ont pu montrer d'amélioration de la fonction cardiaque, telles que l'étude ASTAMI (Lunde 2006). Des points restent encore à éclaircir comme le délai d'injection du produit après l'IDM. Les études sont en faveur d'un délai de quelques jours seulement, excluant ainsi probablement l'utilisation de l'expansion *in vitro* des cellules. Dans *l'insuffisance cardiaque*, les essais cliniques sont moins avancés et très contradictoires. Le potentiel réparateur des CSM est également à l'étude. La sécurité et la faisabilité de l'utilisation de cellules musculaires squelettiques ont été confirmées mais aucune amélioration de la fraction d'éjection et de la contractilité des segments greffés n'a été mise en évidence (Menasche 2008). La détermination de la "cellule souche" thérapeutique idéale, telles que les cellules souches cardiaques, reste également à déterminer dans ce contexte.

**Tableau V : Principaux essais cliniques de thérapie cellulaire chez les patients présentant une pathologie ischémique cardiaque**

		Administration	Type cellulaire	Résultats principaux
<b><i>Syndromes coronariens aigus</i></b>				
2002,2004,2011	essai TOPCARE-AMI	intracardiaque	BM-MNC ou CFU-E C	amélioration de la fraction d'éjection
2006	essai BOOST	intracardiaque	BM-MNC	amélioration de la fraction d'éjection
2006,2009,2010	essai REPAIR-AMI	intracardiaque	BM-MNC	diminution de la mortalité
2004	essai MAGIC cell-3-DES	intracardiaque et mobilisation	PB-MNC	amélioration de la fraction d'éjection
2006	essai ASTAMI	intracardiaque	BM-MNC	pas d'amélioration
2008	essai FINCELL	intracardiaque / patients thrombolysés	BM-MNC	amélioration de la fraction d'éjection
2009	essai MYSTAR	intracardiaque et intramyocarde	BM-MNC	amélioration de la fraction d'éjection
2009	essai REGENT	intracardiaque	BM-MNC + CD34+ CXCR4+	pas d'amélioration
2011	essai BONAMI	intracardiaque	BM-MNC	amélioration de la viabilité myocardique
2011	essai TimeLATE	intracardiaque 2-3 semaines post IDM	BM-MNC	pas d'amélioration
<b><i>Angor réfractaire</i></b>				
2009	Van Ramshorst et al.	intramyocarde	BM-MNC	amélioration de la fraction d'éjection
2007,2011	Losordo et al. essai ACT34-CMI	intramyocarde	BM-CD34+	diminution de la fréquence des crises d'angor et meilleure tolérance à l'exercice
<b><i>Insuffisance cardiaque chronique</i></b>				
2006	Hendriks et al.	intramyocarde	BM-MNC	pas d'amélioration
2007	Tse et al. essai PROTECT-CAD	intracardiaque	BM-MNC	amélioration de la fraction d'éjection
2008	Yao et al.	intracardiaque	BM-MNC	pas d'amélioration
2008	Menashe et al. essai MAGIC	intramyocarde	myoblastes	pas d'amélioration
2008	Kovacic et al. essai GAINI	intracardiaque	G-CSF + CD133+ ou BM-MNC	amélioration dans les résultats subjectifs
2009	Dib et al. essai CAUSMIC	injection guidée endocardiale	myoblastes	bonne faisabilité
2010	Strauer et al. essai STAR	intracardiaque	BM-MNC	amélioration de la fraction d'éjection (suivi 5 ans)
2011	Perin et al. essai FOCUS	intracardiaque	BM-MNC	pas d'amélioration
2011	Bolli et al. essai SCPIO	intracardiaque	cellules souches cardiaques	amélioration de la fraction d'éjection

BM-MNC : bone-marrow mononuclear cells

PE : progéniteurs endothéliaux

### ➤ **Autres applications**

L'utilisation des PEC dans l'hypertension pulmonaire est également en cours d'étude. Cette partie est abordée dans le chapitre de l'hypertension pulmonaire. D'autres domaines d'utilisations des PEC ont été envisagés comme la biocompatibilité des greffons vasculaires et la revascularisation cérébrale.

Malgré les preuves de plus en plus nombreuses du potentiel des PEC en médecine régénérative, les résultats des études précliniques et cliniques de thérapie cellulaire sont contradictoires. Ceci s'explique notamment par l'absence de définition claire des PEC, la diversité des méthodes d'identification et de caractérisation, notamment l'absence de marqueur spécifique permettant de différencier les CE des cellules hématopoïétiques, l'absence de test fonctionnel pour différencier les PEC des CE matures, ainsi que la diversité des rôles attribués à ces cellules dans l'homéostasie vasculaire.

### **4) Angiogenèse pathologique**

L'angiogenèse peut à l'inverse se révéler néfaste, comme dans les rétinopathies diabétiques (Otani 2002) et les tumeurs (Lyden 2001). Dans l'étude de Lyden et al, le blocage de VEGFR-1 ou de VEGF-R2 entraîne une diminution de la croissance tumorale, témoignant de l'implication des progéniteurs endothéliaux et hématopoïétiques dans l'angiogenèse tumorale (Lyden 2001). Kaplan et al ont également montré que la formation des métastases tumorales nécessitait la participation de précurseurs hématopoïétiques exprimant le VEGF-R1 (Kaplan 2005). Par ailleurs, l'injection de cellules médullaires lin- ou de PEC favorise l'angiogenèse au niveau de la rétine (Otani 2002). Enfin, malgré la corrélation inverse entre le taux de PEC et le risque de MCV, les PEC ont été impliqués dans la fragilisation des plaques d'athérosclérose par leur hyper-vascularisation (Virmani 2005). La dualité du rôle des PEC dans l'athérosclérose s'explique peut-être par l'existence de différents types de progéniteurs, ceux dérivées des cellules myéloïdes et ceux purement endothéliaux. L'induction de maladies angiogéniques comme les rétinopathies diabétiques et les tumeurs malignes par greffe de PEC devra donc être sérieusement contrôlée même si aucun effet secondaire n'a été observé dans les études princeps et précliniques.



## IV) L'hypertension artérielle pulmonaire

### IV.1 Définition et classification

L'hypertension pulmonaire (HTP) se caractérise par une obstruction vasculaire pulmonaire conduisant à une augmentation progressive des résistances à l'écoulement sanguin et, à terme, à une défaillance cardiaque droite pouvant être à l'origine du décès du patient en l'absence de traitement. Elle est définie par une pression artérielle pulmonaire moyenne (PAPm)  $\geq 25$  mmHg au repos, mesurée lors du cathétérisme cardiaque droit (Galie 2009). Une PAP occluse  $\leq 15$  mmHg définit une HTP précapillaire.

Il existe plusieurs formes d'hypertensions pulmonaires, regroupées en 5 classes distinctes (**Tableau VI**) en fonction des similitudes qu'elles présentent dans leur physiopathologie, leur présentation clinique et leur prise en charge thérapeutique. La classification a été revue et modifiée à Dana Point (Californie) en 2008 (Simonneau 2009).

L'hypertension artérielle pulmonaire (HTAP) regroupe toutes les formes présentant une atteinte des artères de petit calibre. Qu'elles soient idiopathiques, héritables ou associées à diverses pathologies (connectivite, cardiopathie congénitale, hypertension portale, infection par le VIH, bilharziose, anémie hémolytique chronique) ou à la prise d'anorexigènes, ces formes sont caractérisées par une dysfonction endothéliale pulmonaire et des modifications histologiques similaires, justifiant une prise en charge thérapeutique identique. Des mutations germinales de gènes codant des récepteurs des membres de la superfamille du TGF- $\beta$  (*transforming growth factor- $\beta$* ) tels que BMPRII (bone morphogenetic protein receptor type 2) (Lane 2000), ALK1 (activin-receptor-like kinase-1) et endogline. Les mutations d'ALK-1 et d'endogline sont responsables de la télangiectasie hémorragique héréditaire, maladie caractérisée par la présence de multiples malformations artério-veineuses. Dans la maladie veino-occlusive et l'hémangiomatose capillaire pulmonaire, l'atteinte vasculaire prédomine au niveau des veines et des capillaires. Malgré un pronostic plus sévère, les nombreuses similitudes cliniques et physiopathologiques avec les HTAP idiopathiques justifient leur inclusion dans ce groupe.

Les autres formes d'HTP se distinguent de l'HTAP par l'association à une pathologie bien identifiée permettant aux patients de bénéficier d'un traitement spécifique. Les HTP post-capillaires secondaires aux dysfonctions cardiaques gauches systoliques ou diastoliques ou aux valvulopathies gauches représentent le groupe 2. Le groupe 3 comprend les HTP

complicant les maladies respiratoires chroniques hypoxémiantes, le groupe 4, l'HTP post-embolique chronique. Le groupe 5 comprend les HTP secondaires à des pathologies diverses, hématologiques, systémiques, métaboliques ou autres (Simonneau 2009).

**Tableau VI : Classification OMS des hypertensions pulmonaires (Dana Point, 2008).**

<b>1. Hypertension artérielle pulmonaire</b>
HTAP idiopathique
HTAP héritable (mutation de BMPR2, ALK1, endoglin ou inconnue)
HTAP induite par la prise d'anorexigènes ou toxiques
HTAP associée à :
<i>connectivites</i>
<i>hypertension portale</i>
<i>infection par le virus de l'immunodéficience humaine</i>
<i>cardiopathies congénitales</i>
<i>bilharziose</i>
<i>anémie hémolytique chronique</i>
<i>HTAP persistante du nouveau-né</i>
1* Maladie veino-occlusive et/ou hémangiomatose capillaire pulmonaire
<b>2. Hypertension pulmonaire due à une cardiopathie gauche</b>
Dysfonction systolique
Dysfonction diastolique
Valvulopathie
<b>3. Hypertension pulmonaire due à une affection respiratoire et/ou une hypoxémie</b>
Bronchopneumopathie chronique obstructive
Pneumopathies interstitielles
Affection respiratoire associant un syndrome restrictif et obstructif
Syndrome d'apnée du sommeil et autres syndromes d'hypoventilation alvéolaire
Séjour prolongé en haute altitude
<b>4. Hypertension pulmonaire post-embolique chronique</b>
<b>5. Divers :</b>
Affections hématologiques : <i>syndromes myéloprolifératifs, splénectomie</i>
Maladies systémiques : <i>sarcoïdose, histiocytose X, lymphangioléiomyomatose, neurofibromatose, vascularite</i>
Affections métaboliques : <i>glycogénose, maladie de Gaucher, dysthyroïdies</i>
Autres : <i>médiastinites fibreuses, obstruction tumorale, insuffisance rénale chronique dialysée</i>

La prévalence de l'HTAP est d'environ 15 à 50 par millions d'individus en Europe (Peacock 2007), 15 cas par million en France. Elle représente seulement 10% des HTP mais suscite beaucoup d'intérêt pour la compréhension de sa physiopathologie et le développement de nouveaux traitements. Dans ce travail, nous nous sommes principalement intéressés à

l'HTAP et plus spécifiquement à l'HTAP secondaire aux cardiopathies congénitales. Dans une étude comparative, nous avons inclus des patients ayant développé une HTP post-embolique. Le développement de ces deux formes d'HTP ainsi que les problèmes posés par leur prise en charge thérapeutique sont donc abordés spécifiquement dans cette partie.

### **1) HTAP secondaire aux cardiopathies congénitales**

L'HTAP secondaire aux cardiopathies congénitales représente 13% des cas d'HTAP en France (Beghetti 2006). C'est la deuxième cause à l'origine du développement des formes sévères d'HTP chez l'enfant, allant de 24 à 52% des patients selon les registres (Ivy 2012). Les anomalies cardiaques sont caractérisées par un groupe hétérogène de communications et de connexions anormales entre les cavités cardiaques et les grands vaisseaux, entraînant des troubles hémodynamiques variés. Dans un premier temps, l'existence d'un shunt intra-cardiaque chez ces patients permet au sang de passer de la circulation systémique à la circulation pulmonaire, la résistance de celle-ci étant plus faible. Ceci conduit à une augmentation du flux sanguin et des forces de cisaillement au niveau des artères pulmonaires, responsable d'une dysfonction endothéliale puis à un remodelage progressif de la microcirculation similaire à celui observé dans l'HTAPI. La persistance d'un flux élevé peut conduire à la formation de lésions irréversibles, les lésions plexiformes (cf §IV.3). Face à l'augmentation de la résistance pulmonaire qui en découle, la pression sanguine pulmonaire se rapproche de la pression systémique avec une circulation dans les deux sens. Puis l'aggravation de l'hémodynamique pulmonaire suite au remodelage intense peut conduire parfois à une inversion du shunt, avec passage d'un sang peu oxygéné dans la circulation systémique, et au développement du syndrome d'Eisenmenger en l'absence de traitement. Le syndrome d'Eisenmenger désigne en fait l'ensemble des symptômes traduisant l'existence de cette HTAP irréversible et qui sont liés à l'inversion du shunt, soit principalement une cyanose, une dyspnée, une asthénie et des céphalées. La probabilité de développer ce syndrome dépend de la taille, de la localisation de l'anomalie intra-cardiaque et de l'existence de facteurs environnementaux ou génétiques concomitants. L'âge de développement de la maladie dépend également du type d'anomalie congénitale (Vongpatanasin 1998).

On distingue des formes réversibles et des formes irréversibles de ce type d'HTAP, en fonction de la présence ou non d'une HTP résiduelle un an après la chirurgie corrigeant la malformation. Or un patient évoluant d'une forme irréversible d'HTAP en syndrome d'Eisenmenger a un meilleur pronostic que lors d'une clôture du shunt intra-cardiaque au stade

où des lésions irréversibles sont déjà présentes (Balint 2008). La détermination du stade de la maladie est donc indispensable pour la prise en charge thérapeutique des patients. Leur classification est actuellement basée sur les examens cliniques et les critères hémodynamiques essentiellement (Lopes and O'Leary 2009), mais dans certains il n'existe pas de méthode suffisamment sensible ou spécifique pour déterminer le caractère réversible de la pathologie post-chirurgie.

## **2) HTP post-embolique**

Le développement de l'HTP post-embolique (HTP-PE) (groupe 4) est lié à la persistance et à l'organisation fibreuse de caillots au sein des artères pulmonaires après un ou plusieurs événements thrombo-emboliques (Jais 2007). La redistribution du sang dans les artères non obstruées entraîne une augmentation de la PAP dans celles-ci. Ces phénomènes peuvent conduire au développement d'une dysfonction voire d'une véritable artériopathie secondaire des petits vaisseaux pulmonaires, à l'origine de l'aggravation de l'hypertension. Les lésions observées dans les cas sévères sont alors similaires à celles de l'HTAPI, des lésions plexiformes ont même été décrites dans quelques cas (Moser and Bloor 1993).

Le traitement de l'HTP-PE repose sur des anticoagulants oraux à vie afin d'éviter les récurrences thrombo-emboliques. Lorsque les patients sont symptomatiques et que l'obstruction est en position proximale, le traitement repose sur l'endartériectomie. Dans les formes distales, la prise en charge thérapeutique est la même que dans l'HTAP. Cependant, la distinction entre les formes distales et proximales n'est plus incluse dans la classification en l'absence de critères rigoureux permettant de les séparer et de définir l'opérabilité des patients (Sanchez 2010).

## **IV.2 Diagnostic**

La suspicion clinique d'HTP repose sur la présence d'un tableau clinique compatible associant dyspnée d'effort et/ou douleurs thoraciques, des hémoptysies, des signes cliniques d'insuffisance ventriculaire droite, et l'existence d'antécédents (Sanchez 2010). Des symptômes disproportionnés par rapport à la sévérité de l'atteinte fonctionnelle causée par une pathologie sous-jacente incitent aussi à rechercher une HTP associée. L'examen initial de choix lors de la suspicion d'une HTP est l'échocardiographie cardiaque. Elle permet la détection d'une HTP sur les données morphologiques du cœur droit et donne une estimation de la PAPm. Elle permet également de rechercher une dysfonction ventriculaire gauche

systolique ou diastolique et une valvulopathie (HTP du groupe 2). Toutefois, c'est le cathétérisme cardiaque droit qui demeure l'examen de référence qui seul permet d'affirmer le diagnostic d'HTP. Cet examen consiste à mesurer la pression artérielle pulmonaire ainsi que le débit cardiaque. La résistance pulmonaire est déduite de ces deux paramètres. Le cathétérisme cardiaque droit détermine le caractère pré ou post-capillaire, la sévérité hémodynamique et la réponse aux traitements vasodilatateurs (le NO est le plus utilisé). On effectue parfois un test de marche de 6 minutes pour évaluer les capacités à l'exercice des patients afin de renforcer la sensibilité de détection d'une HTP limite au repos. Le diagnostic d'HTAP est posé après exclusion des HTP secondaires (groupes 2 à 5). L'évaluation du pronostic occupe une place importante pour le choix du traitement initial, l'évaluation de la réponse au traitement et la décision de majorer le traitement. La tolérance à l'effort est évaluée d'après la classe fonctionnelle de la *New York Heart Association* (NYHA) et est un élément pronostique majeur. Certains paramètres mesurés par le cathétérisme droit sont associés à un pronostic moins favorable, tels que l'élévation de la pression auriculaire droite et des résistances vasculaires pulmonaires, l'abaissement du débit cardiaque et de la saturation veineuse en oxygène. L'existence d'une réponse vasodilatatrice en aigu au NO est un facteur de bon pronostic. Des marqueurs plasmatiques sont également associés à un mauvais pronostic, tels que l'élévation de la concentration en acide urique pour l'HTAPI, ou des peptides natriurétiques (BNP, NT-ProBNP) dans l'HTAPI ou associée à une sclérodermie (Sanchez 2010). Ces marqueurs sont utilisés pour le suivi du patient et permettent d'orienter les décisions thérapeutiques.

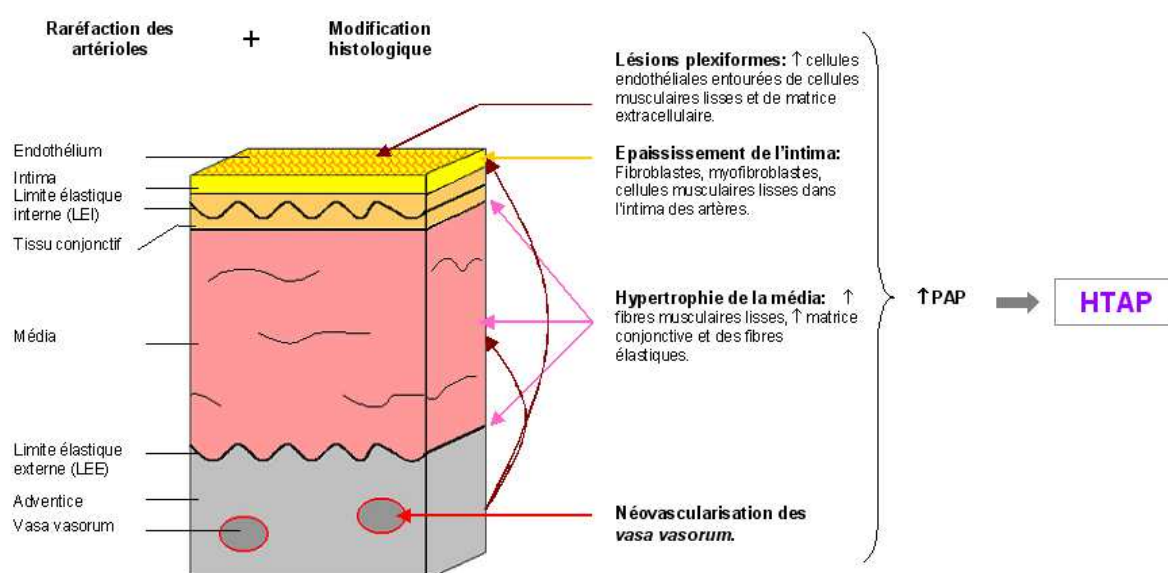
### **IV.3 Physiopathologie**

L'augmentation des résistances vasculaires pulmonaires est liée à de nombreux facteurs tels que la vasoconstriction, le remodelage de la paroi des vaisseaux pulmonaires et la thrombose.

#### **1) Histologie**

Le remodelage vasculaire pulmonaire est présent dans toutes les formes d'HTP. Il concerne les trois tuniques de la paroi vasculaire et tous les types cellulaires (**Figure 9**), CML, CE et fibroblastes, à des degrés variables selon les types d'HTP (Wilkins 2012). La circulation pulmonaire fonctionne avec des faibles pressions de perfusion grâce à sa grande capacité de recrutement des vaisseaux pulmonaires non perfusés. La raréfaction des artérioles pré-

capillaires observée initialement conduit à une augmentation de la résistance vasculaire. Le remodelage vasculaire impliquant les CML et les fibroblastes se manifeste par une muscularisation des petites artères pulmonaires périphériques, caractéristique commune à toutes les formes de remodelage d'HTAP et un épaississement de la media des vaisseaux de plus gros calibre. La formation d'une néo-intima, caractéristique de l'HTAP, est liée à la migration de CML de la media et à l'accumulation de collagène et de mucopolysaccharides et à des infiltrats inflammatoires entre l'endothélium et la lamina élastique interne. Elle conduit à l'occlusion des vaisseaux et à la formation des lésions plexiformes dans les formes sévères d'HTP. Les lésions plexiformes correspondent à une prolifération focale de CE entourées de myofibroblastes, de CML et de matrice extra-cellulaire. La formation des lésions plexiformes est un processus dynamique, n'impliquant au départ que les CE, puis recrutant des myofibroblastes (Cool 1999). Ces lésions sont présentes dans 80% des HTAP idiopathiques et dans les formes sévères d'HTAP secondaires. Une étude réalisée dans l'HTAP secondaire aux cardiopathies congénitales a montré la présence de lésions plexiformes dans 10 cas sur 11 pour les formes irréversibles, alors qu'elles ne sont pas retrouvées dans les formes réversibles (Lévy 2007). Elles constituent un marqueur d'irréversibilité, de mauvais pronostic et signent une forme sévère de la maladie (Lee 1998). Enfin, dans de nombreuses formes d'HTP, une néovascularisation des vasa vasorum se développe, principalement au niveau de l'adventice, fournissant une voie d'accès aux cellules progénitrices.



**Figure 9 : Localisation des anomalies histologiques apparaissant au cours du développement d'une HTAP.**

## 2) Rôle central de la cellule endothéliale dans l'HTAP

Des évènements initiateurs environnementaux et génétiques seraient à l'origine d'une dysfonction endothéliale qui joue un rôle clé dans le développement de l'HTAP. Cette dysfonction s'exprime par un déséquilibre de la production de médiateurs conduisant à une vasoconstriction, une prolifération des CML et des CE responsable du remodelage vasculaire, ainsi qu'à des phénomènes de thrombose (**Figure 10**). Le degré d'implication de ces différents éléments varie selon le type d'HTP (Wilkins 2012).

D'autres facteurs non liés à la dysfonction endothéliale sont impliqués dans la contraction et la prolifération des CML. La concentration plasmatique de la sérotonine (5-hydroxytryptamine, 5-HT) est augmentée dans l'HTAP, en raison d'une augmentation de sa libération par les plaquettes et une diminution de sa recapture (Humbert 2008). En plus de son effet vasoconstricteur, elle stimule la prolifération des CML et des fibroblastes. L'inhibition des canaux potassiques voltage-dépendants des CML conduit à une vasoconstriction, inhibe l'apoptose et potentialise la division cellulaire. De même, la fonction altérée des canaux calciques des CML contribue à la vasoconstriction et stimule la prolifération cellulaire. La résistance à l'apoptose des CML impliquerait de nombreux autres facteurs, dont la mutation de *BMPRII*, des anomalies mitochondriales, l'expression de protéines anti-apoptotiques et l'expression de récepteurs au PDGF. D'autres éléments contribuent au remodelage vasculaire comme l'augmentation de la production des élastases par les CML qui peuvent libérer des facteurs mitogènes et activer les MMP (Rabinovitch 2008).

Seul le rôle central de l'endothélium dans le développement de l'HTAP sera abordé dans les paragraphes suivants.

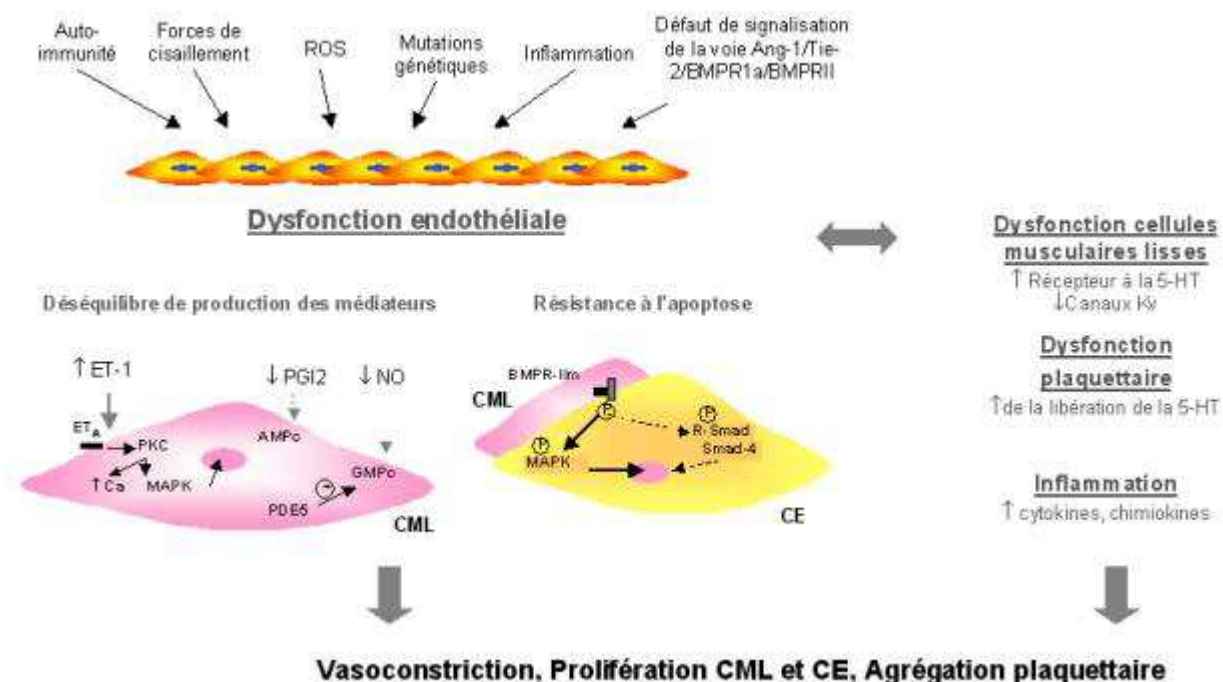


Figure 10 : Physiopathologie de l'HTAP

## 2.1 Initiation de la dysfonction endothéliale

Les mécanismes à l'origine de la dysfonction endothéliale ne sont pas encore complètement élucidés. Ils comprennent des facteurs environnementaux comme l'augmentation des forces de cisaillement suite à une augmentation du débit pulmonaire, l'hypoxie alvéolaire, des infections virales contribuant au développement d'un environnement proinflammatoire (Cool 1999). L'auto-immunité a également été évoquée comme facteur initiateur après la détection d'autoanticorps dirigés contre les CE (Tamby 2005). Des facteurs génétiques, comme la mutation de *BMPRII*, semblent également impliqués dans le développement de l'HTAP mais ne suffisent pas à eux seuls. La dysfonction du BMPRII est impliquée dans la prolifération des CE et des CML.

## 2.2 Déséquilibre de production de médiateurs endothéliaux

Le déséquilibre de production des médiateurs endothéliaux suite à l'activation de l'endothélium conduit à une vasoconstriction et une prolifération des CML, ainsi qu'au développement d'un état prothrombotique.

On observe ainsi une diminution de l'expression de la PGI<sub>2</sub> synthase, conduisant à une production moindre de la PGI<sub>2</sub> comme le témoigne la baisse de concentrations de ses



métabolites urinaires (Galie 2003). L'administration de prostacycline constitue d'ailleurs un traitement des formes sévères d'HTAP. A l'inverse, la production du TXA<sub>2</sub> est induite, reflétant un état d'activation de l'endothélium (Wilkins 2012). Le TXA<sub>2</sub> est un agent vasoconstricteur et agrégant plaquettaire, il favorise également la prolifération des CML.

D'autre part, une diminution de la biodisponibilité du NO est impliquée dans toutes les formes d'HTP. Celle-ci est liée à une diminution de l'expression de la eNOS, au stress oxydant qui consomme le NO par formation de peroxynitrite avec les radicaux libres, ainsi qu'à l'inhibition de la synthèse de NO par augmentation de la concentration de son inhibiteur naturel, l'ADMA (asymétrique diméthylarginine) (Wilkins 2012). La diminution de GMPc qui en résulte est amplifiée par l'augmentation de l'expression de l'enzyme qui le métabolise, la PDE5 (phospho diestérase de type 5). Etant un des principaux mécanismes de vasodilatation au niveau pulmonaire, la voie du NO présente un grand intérêt thérapeutique.

En parallèle, une augmentation de l'ET-1 au niveau pulmonaire a été décrite dans l'HTAP, l'HTP post-embolique chronique et l'HTP associée aux pathologies pulmonaires obstructives.

### **2.3 Augmentation de la perméabilité endothéliale**

La perméabilité de l'endothélium est augmentée dans l'HTAP suite à son agression directe, en réponse au VEGF ou aux médiateurs de l'inflammation (Budhiraja 2004) et à l'apoptose des CE. Elle permet l'accès des facteurs de croissance au sous-endothélium et donc la prolifération des CML de la media et de l'adventice, l'interaction des plaquettes avec le collagène, et l'activation de la coagulation.

### **2.4 CE et inflammation**

La présence de cellules inflammatoires au sein des lésions plexiformes et d'anticorps anti-CE et anti-fibroblastes montre que l'inflammation contribue au développement de l'HTAP (Tamby 2005). Lévy et al ont observé la présence d'infiltrats inflammatoires dans toutes les formes irréversibles et quelques formes réversibles d'HTAP secondaire aux cardiopathies congénitales (Levy 2007). Bien que la composition cellulaire soit similaire entre les deux formes, seules les cellules inflammatoires des formes irréversibles présentaient un phénotype prolifératif avec une diminution de leur activité proapoptotique et une augmentation de l'expression des marqueurs anti-apoptotiques. De même, les taux plasmatiques de certaines

cytokines et chémokines sont élevés chez les patients souffrant d'HTAP, favorisant l'attraction et la migration des leucocytes au sein de la paroi vasculaire, telles que l'IL-1 et l'IL-6 (Humbert 2008), le SDF-1 et le MCP-1 (monocyte chemoattractant protein 1) (Rabinovitch 2008).

## **2.5 CE et thrombose**

La dysfonction endothéliale prédispose à la thrombose dans certaines formes d'HTP, dont l'HTAP et l'HTP post-embolique chronique. Le FT est très exprimé dans les vaisseaux pulmonaires des patients atteints d'HTAP (White 2007), initiant la coagulation et favorisant l'angiogenèse. Comme cité précédemment, la diminution de la synthèse endothéliale de PGI<sub>2</sub> et du NO, anti-agrégant, et une augmentation du TXA<sub>2</sub> favorisent l'activation plaquettaire et la libération de médiateurs granulaires intervenant dans la vasoconstriction et le remodelage vasculaire tels que le TXA<sub>2</sub>, le PDGF, la 5-HT, le TGFβ et le VEGF. La diminution du débit sanguin dans la circulation pulmonaire suite à l'occlusion des vaisseaux contribue également au développement d'un état prothrombotique. Des taux élevés de P-sélectine et diminués de thrombomoduline ont été décrits dans l'HTP (Sakamaki 2001), ainsi qu'une augmentation de l'expression du FVW et du facteur VIII (Budhiraja 2004).

## **2.6 Prolifération endothéliale**

### **➤ Sélection de CE résistantes à l'apoptose**

Dans un modèle expérimental d'HTP chez le rat, l'administration de SU5416 (inhibiteur du VEGF-R) associée à une hypoxie chronique, induit une première phase d'apoptose massive à l'origine de la sélection de CE résistantes à l'apoptose, hyperprolifératives et exprimant des molécules de survie comme la survivine (Sakao 2005). L'étude des coupes histologiques de poumon de patients souffrant d'HTAP secondaire aux cardiopathies congénitales confirme cette hypothèse (Levy 2007). Des molécules proapoptotiques étaient en effet exprimées par les CE pulmonaires des patients, absentes sur les coupes histologiques des sujets contrôles, confirmant l'hypothèse d'un mécanisme apoptotique initiateur. De plus, un phénotype de résistance à l'apoptose était décrit exclusivement dans les formes irréversibles, avec une expression spécifique du marqueur anti-apoptotique bcl-2 dans les CE des artères présentant une fibrose intimale sévère (Levy 2007). Dans les lésions plexiformes de patients atteints d'HTAP secondaires à une sclérodermie ou au HIV, les CE expriment le Ki-67, marqueur de prolifération (Cool 1997).

### ➤ Voie du BMPRII

Le BMPRII est exprimé par les CE, les CML et les fibroblastes. La cascade intracellulaire de signalisation fait intervenir un autre récepteur dit de type I, le plus souvent BMPRIA, et les protéines de la famille Smad (Figure 10). La voie de la p38<sup>MAPK</sup> intervient aussi dans la transmission du signal. L'équilibre entre ces deux voies dépend de l'agoniste et du type cellulaire (Morrell 2009). Les mutations des gènes codant le BMPRII conduisent à une diminution de fonction de ce récepteur qui s'exprime différemment dans les CE et les CML. Teichert et al ont observé une augmentation de l'apoptose des CE en réponse à un agoniste de BMPRII qui, à l'inverse, induit la survie des cellules chez les sujets contrôles (Teichert-Kuliszewska 2006). Cette susceptibilité à l'apoptose pourrait expliquer la raréfaction des artérioles et la sélection de clones résistants à l'apoptose. A l'inverse, la perte de fonction du BMPRII dans les CML induit leur prolifération en réponse au TGF- $\beta$ 1 et au BMP2 (*bone morphogenic protein*) au lieu de l'inhibition de la prolifération et de la susceptibilité à l'apoptose (Rabinovitch 2008). De plus, l'expression du BMPRII est clairement diminuée dans l'HTAPI même en l'absence de mutation (Atkinson 2002). Assez souvent, celle de son co-récepteur le BMPRIA l'est aussi (Du 2003). Cependant, il semblerait que la diminution isolée de BMPRIA protège finalement de la muscularisation et la perte des artères pulmonaires (Rabinovitch 2008). L'augmentation des agonistes de ces récepteurs pourrait aussi être impliquée dans le développement de l'HTAP (Rabinovitch 2008). Des études récentes ont porté sur les conséquences de la perte de fonction de BMPRII sur le facteur de transcription de gènes ID1 (inhibitor of DNA-binding) et PPAR $\gamma$  (Peroxisome proliferator-activated receptor). Une diminution de l'expression de PPAR $\gamma$  a été décrite dans les lésions plexiformes (Wilkins 2012). Or, ce facteur active, entre autres, la transcription de l'apoE, qui internalise le corécepteur au PDGF, limitant ainsi ses effets prolifératifs (Rabinovitch 2008). La diminution de l'effet antiprolifératif des BMPs contribue ainsi au remodelage et à l'oblitération vasculaire.

### ➤ Clonalité des CE

La clonalité des CE qui composent ces lésions permet de distinguer les formes idiopathiques des formes secondaires. Les CE sont en effet d'origine monoclonale dans 80% des HTAPI, contrairement aux HTAP secondaires où elles sont polyclonales (Lee 1998). Cela suggère qu'une mutation somatique, associée ou non à une susceptibilité génétique est un facteur conduisant à l'expansion clonale des CE pulmonaires dans l'HTAPI. D'autre part, la présence de plusieurs foyers monoclonaux suggèrent que ce sont des cellules souches présentes dans la paroi vasculaire qui prolifèrent (Tuder 1998). Les mécanismes à l'origine

de la prolifération des CE des HTAP secondaires sont différents et impliqueraient des forces de cisaillement élevées, un flux sanguin pulmonaire élevé et des conditions proinflammatoires (Lee 1998).

## **2.7 Transition CE-cellules mésenchymateuse**

La transformation des CE et des progéniteurs circulants ou résidents, en cellules mésenchymateuses, semble également contribuer à la muscularisation des artères. Des cellules présentant des caractéristiques de CE et de CML vasculaires ont en effet été identifiées dans les lésions plexiformes de patients avec des formes angioprolifératives d'HTAP (Sakao 2009). Une modification du métabolisme mitochondrial, observée dans les CE résistantes à l'apoptose (Xu 2007), a été retrouvée dans les CML. La sélection des CE par le SU5416 a conduit à l'expansion de cellules progénitrices résidentes en CML-like (Sakao 2007).

## **3) Angiogenèse et HTAP**

Il apparaît très difficile de distinguer le rôle de l'angiogenèse dans le développement et la progression de l'hypertension pulmonaire. En effet, dans les formes associées à l'hypoxie, une raréfaction vasculaire est décrite, probablement par apoptose des CE et des péricytes, entraînant une aggravation de l'hypoxie à l'effort (Hopkins and McLoughlin 2002). A l'inverse, les lésions plexiformes observées dans l'HTAP montrent des aspects complexes de néoangiogenèse non régulée qui joue un rôle néfaste dans le développement de la pathologie (Tuder 2001). De plus, une étude a montré l'implication de PEC hyperprolifératifs mais avec des propriétés de vasculogenèse altérées dans le remodelage vasculaire associée à l'HTAP (Toshner 2009).

## **3.1 Facteurs pro-angiogéniques**

La description d'une angiogenèse non contrôlée dans les lésions plexiformes a suggéré un rôle des facteurs pro-angiogéniques dans le développement de la maladie (Tuder 2001). Les CE exprimaient en effet le VEGF, son récepteur le VEGF-R2, et Tie-2 (Tuder 1998). L'étude de Lévy et al est également en faveur de l'existence d'un processus angiogénique, en réponse à l'occlusion des vaisseaux dans lesquels se sont développées des lésions plexiformes (Levy 2007). Le VEGF et la eNOS étaient en effet exprimés par toutes les CE mais plus

fortement dans les formes irréversibles que dans les formes réversibles et chez les contrôles, et des structures CD34+ ont été observées près de tous les vaisseaux occlus. De plus, l'expression du VEGF était corrélée à celle de la eNOS et du marquage CD34 dans les formes irréversibles. Le VEGF induit la surexpression de molécules anti-apoptotiques telles que bcl-2 (Grosjean 2006). Son augmentation potentialise la survie des CE, contribuant ainsi au développement des lésions plexiformes. Son inhibition conduit au développement d'une HTP sévère dans les modèles animaux (Budhiraja 2004).

L'expression de nombreux autres facteurs de croissance est accrue dans les poumons de patients atteints d'HTAP : le PDGF, l'Ang-1, le bFGF (*basic fibroblast growth factor*), l'IGF-1 (*insulin-like growth factor-1*), l'EGF (*epidermal growth factor*) (Humbert 2004) et le FGF2 (Izikki 2009). Le PDGF est synthétisé par les CML, les CE et les macrophages (Humbert 2008). Il induit la prolifération et la migration des CML et des fibroblastes. L'inhibition du PDGF-R par l'imatinib a montré des améliorations cliniques et hémodynamiques dans quelques cas d'HTAP (Ivy 2012). L'Ang-1 est très exprimée dans les poumons de patients atteints de différentes formes d'HTP, et son taux est corrélé avec la sévérité de la maladie (Du 2003). Une hyperphosphorylation de son récepteur Tie-2 a aussi été décrite. Mais les observations concernant son rôle sont contradictoires. Un modèle expérimental de rongeurs exprimant l'Ang-1 de manière constitutive au niveau pulmonaire montre le développement d'une HTP sévère. L'Ang-1 stimulerait la production de la 5-HT par les CE par l'intermédiaire du récepteur Tie-2, promouvant ainsi la prolifération des CML (Sullivan 2003). En culture, l'Ang-1 diminue l'expression de BMPRII conduisant alors à une prolifération anormale des cellules. Mais il a également été montré un rôle protecteur de l'Ang-1 dans l'HTP induite par la MCT chez le rat (Zhao 2003).

### **3.2 Progéniteurs endothéliaux circulants**

#### **➤ Etudes observationnelles**

Plusieurs études observationnelles réalisées dans un modèle expérimental d'hypertension pulmonaire induite par l'hypoxie ont observé une mobilisation de CMN dérivées de la moelle osseuse et un recrutement de cellules endogènes au niveau du poumon et des vaisseaux pulmonaires. Davie et al ont observé une augmentation de cellules c-kit+ dans le sang périphérique ainsi que leur diminution au niveau médullaire, et identifié ces cellules au niveau des vasa vasorum chez le veau (Davie 2004). Hayashida et al ont identifié des cellules c-kit+ dérivées de la MO au niveau des artères, celles-ci exprimant à la fois des

marqueurs endothéliaux et spécifiques des CML (Hayashida 2005). Satoh et al ont observé la mobilisation de cellules CXCR4+KDR+ckit+ dans l'adventice de souris (Satoh 2009). Par ailleurs, Marsboom et al ont décrit une diminution des capacités pro-angiogéniques des CFU-EC chez la souris (Marsboom 2008). Ces résultats suggèrent l'existence d'un mécanisme compensatoire de mobilisation et recrutement de PEC dans l'HTP mais qui se révèle insuffisant car ces cellules présentent un défaut de fonctionnalité. L'ensemble de ces études n'est pas en faveur d'un rôle pathogène des PEC dans ce modèle, comme l'appuie l'aggravation de l'HTP chez les souris EPOR-/- chez qui la mobilisation des PEC est complètement inhibée (Satoh 2006).

Les études réalisées chez l'homme ont montré des résultats contradictoires ne permettant pas de conclure sur le rôle exact des PEC, à la fois en termes de quantification des PEC et de fonctionnalité. Ils sont résumés dans le **tableau VII**.

Certains ont observé une diminution du nombre de PEC en comparaison à des sujets contrôles. Diller et al ont observé une diminution des cellules CD34+KDR+ dans l'HTAP idiopathique et le syndrome d'Eisenmenger (Diller 2008). Fadini et al ont décrit une diminution des cellules CD34+CD133+KDR+ dans l'HTP secondaire à la fibrose pulmonaire idiopathique (Fadini 2007). Junhui et al ont montré une diminution des cellules CD133+KDR+ et des CFU-EC dans l'HTAP idiopathique (Junhui 2008). Cette diminution pourrait s'expliquer par un défaut de mobilisation des cellules. En effet, une baisse d'expression de la eNOS au niveau des lésions plexiformes pulmonaires (Giaid and Saleh 1995), des concentrations élevées de diméthylarginine asymétrique (ADMA), inhibiteur de la NOS (Pullamsetti 2005) et la présence de marqueurs d'inflammation (Humbert 1995) ont été observés, conduisant tous à une altération de la mobilisation des cellules progénitrices. Cette diminution pourrait aussi être le reflet d'une tentative de réparation endothéliale avec consommation des progéniteurs qui se révèle insuffisante pour pallier les lésions endothéliales existantes/continues. D'ailleurs, la capacité angiogénique des CFU-EC semble altérée dans l'HTAPI (Junhui 2008) et chez les patients ayant un syndrome d'Eisenmenger (Diller 2008), ainsi que la production de facteurs angiogéniques (Diller 2008). Cet épuisement pourrait aussi être lié à une grande mobilisation des PEC lors de la formation des lésions plexiformes, dont l'accès est facilité par une néovascularisation importante de l'adventice (Humbert 2004).

A l'inverse, d'autres groupes ont décrit une augmentation des PEC dans l'HTP. Asosingh et al ont montré une augmentation des CFU-EC et des cellules progénitrices circulantes CD34+CD133+ dans l'HTAP idiopathique, sans modification du nombre d'ECFC, dans le

sang périphérique et au niveau des artères pulmonaires, ainsi qu'une corrélation entre le nombre de cellules CD34+CD133+ et la PAP (Asosingh 2008). Les capacités prolifératives des CFU-EC étaient accrues chez ces patients. Yao et al ont identifié des cellules CD34+KDR+ au sein des tissus endartériectomisés de patients souffrant d'HTP thrombo-embolique chronique (Yao 2009). Toshner et al ont décrit une augmentation des cellules CD34+CD133+KDR+ dans l'HTAP idiopathique (Toshner 2009) ainsi que la présence de cellules progénitrices (CD45+CD133+ ou c-kit+) au niveau des lésions vasculaires pulmonaires, telles que les lésions plexiformes et les lésions occlusives. L'origine de ces cellules, résidentes ou provenant de la circulation n'est pas connue. Cependant, l'expression de SDF-1 et de son récepteur le CXCR4 au niveau des lésions est en faveur d'un mécanisme de mobilisation des cellules (Toshner 2009), ainsi que l'amélioration de l'hypertension lors de l'inhibition du recrutement de cellules progénitrices par la voie SDF-1/CXCR4 (Young 2009). Toshner et al ont décrit un phénotype hyperprolifératif des ECFC de patients souffrant d'IPAH et mutés pour le récepteur BMPRII, ainsi qu'une diminution de leur capacité à former un réseau vasculaire, en comparaison à des sujets contrôles (Toshner 2009).

Les divergences des résultats obtenus peuvent s'expliquer en partie par le type de cellules progénitrices étudiées et les techniques utilisées. Des études interventionnelles ont été réalisées chez l'animal afin d'acquérir d'autres éléments concernant le rôle des PEC dans l'hypertension pulmonaire.

**Tableau VII : Résumé des résultats de l'exploration des cellules progénitrices dans l'HTAP.**

Type cellulaire	Nombre	Activité	Pathologie	Références
CD34+	diminution		SE	Diller 2008
CD34+CD45dim	diminution		SE	
CD34+CD133+	diminution		SE	
CD34+KDR+	diminution		HTAPI - SE	
CD34+CD133+KDR+	diminution		HTAPI - SE	
CFU-EC	diminution		SE	
CAC		diminution	SE	
VEGF	diminution		SE	
CD34+	diminution		FPI = HTP-FPI	Fadini 2007
CD133+KDR+	diminution		FPI = HTP-FPI	
CD34+CD133+KDR+	diminution		FPI > HTP-FPI	
CD133+KDR+	diminution		HTAPI	Junhui 2008
CAC	diminution	diminution	HTAPI	
VEGF	augmenté		HTAPI	
CD34+CD133+	augmentation		HTAPI	Asosingh 2008
ECFC	NS		HTAPI	
CFU-EC	augmentation	augmentation	HTAPI	
CD34+CD133+KDR+	augmentation		HTAPI	Toshner 2009
CD34+CD133+KDR-	NS		HTAPI	
ECFC		prolifération augmentée, formation des tubes diminuée	HTAPI <i>BMPR2</i> +	

### ➤ Etudes interventionnelles

Les études chez l'animal ont montré un bénéfice de la thérapie cellulaire à partir de cellules dérivées de la MO et de CMN après un temps court de culture. Cependant les résultats obtenus diffèrent selon le modèle animal utilisé. En effet, une amélioration des paramètres hémodynamiques et du remodelage pulmonaire ainsi qu'un gain de survie ont été observés dans les modèles d'HTP induite par la monocrotaline (MCT) mais pas dans les modèles d'HTP secondaire à l'hypoxie. Dans un modèle murin d'HTP induite par hypoxie, l'injection de PEC Sca1+KDR+CXCR4+ n'a pas permis de rétablir la structure vasculaire ni l'hémodynamique pulmonaire (Marsboom 2008). Dans une autre étude utilisant le même modèle, une élévation de la pression systolique artérielle droite et la muscularisation artérielle ont été observées malgré l'injection de cellules médullaires enrichies en progéniteurs après traitement par du 5-fluorouracile (Raoul 2007). A l'inverse, l'administration de ces mêmes



cellules dans un modèle d'HTP induite par MCT a pu prévenir le développement de la maladie, et les cellules injectées ont été identifiées au niveau du poumon (Raoul 2007). Dans un modèle d'HTP induite par la MCT réalisé chez le rat, des CMN dérivées de MO ont été cultivées pendant 7 à 10 jours. Zhao et al ont alors montré l'efficacité de l'injection des cellules progénitrices endothéliales-like obtenues dans la prévention du développement de la maladie, et leur incorporation au niveau de l'endothélium pulmonaire lésé (Zhao 2005). Dans ce même modèle animal, Spees et al ont également observé la présence de cellules dérivées de la MO injectées, au niveau du tissu pulmonaire (Spees 2008). Les analyses par microarray et immuno-histochimie ont montré que ces cellules étaient majoritairement des fibroblastes, quelques cellules hématopoïétiques, quelques cellules épithéliales pulmonaires, des CE vasculaires et des CML. D'autres n'ont pu démontrer la contribution des cellules dérivées de la moelle osseuse dans le remodelage artériel pulmonaire de l'HTP induite par MCT (Sahara 2007). Par ailleurs, le seul groupe à avoir testé l'efficacité des ECFC dans un modèle d'HTAP induite par MCT chez le rat n'ont pas observé d'amélioration, contrairement aux PEC précoces (Ormiston 2009). L'effet des PEC précoces semblait en fait s'exercer par un mécanisme immunitaire impliquant la stimulation des cellules NK.

Au total, l'administration de CMN et de PEC précoces semble efficace seulement dans le modèle d'HTP induite par MCT, toxine responsable de lésions endothéliales, et pas dans le modèle d'hypoxie. Cependant, les modèles animaux utilisés présentent des différences dans les mécanismes physiopathologiques impliqués, notamment sur le versant inflammatoire (Stenmark 2009). Par ailleurs, les lésions intinales obstructives ou les lésions plexiformes ne se développent pas dans ces modèles animaux, lésions pourtant caractéristiques de certaines formes d'HTAP (Stenmark 2009).

Malgré cela, les résultats obtenus en clinique indiquent que l'utilisation de PEC autologues des patients souffrant d'HTAPI est sûre et que leur efficacité doit être confirmée dans des essais cliniques en aveugle versus placebo. En effet, deux études pilotes réalisées par la même équipe chez l'homme dans l'HTAPI ont montré que l'injection de PEC autologues conduisait à une amélioration du test de marche et de l'hémodynamique pulmonaire après 12 semaines (Wang 2007; Zhu 2008). Dans ces deux essais, les patients ont reçu des PEC, probablement des PEC précoces, après expansion *ex vivo*. Les CMN isolées de 250 ml (adulte) ou 80-150 ml (enfants) de sang ont été cultivées pendant 5 jours sur fibronectine dans du milieu de culture contenant 20% de sérum des patients et du VEGF. Plus de 90% des cellules ont été caractérisées comme endothéliales. Dans la première étude, réalisée chez 31

patients adultes souffrant d'HTAPI, 16 ont reçu un traitement conventionnel et 15 ont été transfusés avec les PEC autologues en plus du traitement conventionnel après randomisation (Wang 2007). Le nombre de PEC CD34<sup>+</sup>CD133<sup>+</sup>KDR<sup>+</sup> injectés a été évalué à  $1,1 \pm 0,6 \cdot 10^7$  cellules (allant de  $0,4$  à  $2,2 \cdot 10^7$  cellules). Après 12 semaines, une amélioration significativement plus importante du test de la marche a été rapportée chez les patients ayant reçu des cellules autologues, ainsi qu'une amélioration de la PAPm et de la résistance vasculaire pulmonaire sans événements secondaires liés à la transfusion. Ces résultats ont été confirmés dans un deuxième essai non randomisé réalisé dans une population pédiatrique (Zhu 2008). Trente enfants souffrant d'HTAPI ont reçu des PEC autologues. Le nombre de PEC CD34<sup>+</sup>CD133<sup>+</sup>KDR<sup>+</sup> injectés a été évalué à  $0,6 \pm 0,33 \cdot 10^7$  cellules (allant de  $0,2$  à  $1,3 \cdot 10^7$  cellules). Aucun effet secondaire lors de l'injection n'a été relevé et une amélioration du test de marche, de la classe fonctionnelle NYHA et de l'hémodynamique pulmonaire a été observée 12 semaines après l'injection.

Pour conclure les PEC précoces semblent avoir un effet bénéfique dans les modèles animaux d'HTP, mais par leur action sur la réaction inflammatoire et non par leur potentiel proangiogénique. Le mécanisme de l'effet bénéfique observé dans les deux études réalisées chez l'homme n'est pas expliqué et ces résultats doivent être confirmés. Deux essais cliniques de thérapie cellulaire dans l'HTAP sont actuellement en cours, l'un au Canada (NCT00469027) évaluant l'administration de cellules progénitrices autologues transfectées pour la eNOS, l'autre en Chine (NCT00372346) basée sur l'injection de PEC. En ce qui concerne les ECFC, une seule étude a montré l'absence d'effet bénéfique de ces cellules. de plus, on ne peut pas conclure en ce qui concerne l'absence d'effet des PEC observé dans certaines études, les modèles animaux ne développant pas de lésions plexiformes.

#### **IV.4 Traitements**

##### **1) Traitement conventionnel**

Le traitement des HTP tente de s'opposer aux effets délétères de la vasoconstriction, de l'obstruction vasculaire pulmonaire par remodelage et thrombose et de l'insuffisance cardiaque droite. La limitation des efforts est la première mesure à appliquer. Le traitement conventionnel repose sur des traitements non spécifiques : diurétiques, anticoagulants (anti-vitamine K à dose curative) ou oxygénothérapie.

Le traitement des HTP secondaires est principalement celui de la pathologie associée. Les vasodilatateurs et antiprolifératifs sont contre-indiqués dans les HTP des groupes 2 et 3. Dans le groupe 3, les traitements spécifiques de l'HTAP n'ont pas été testés car la maladie est généralement peu sévère et l'oxygénation longue durée s'avère suffisante. Le traitement du groupe 4 repose sur la chirurgie. En ce qui concerne l'HTAP, le développement des traitements s'est basé sur les mécanismes impliqués dans le développement de la pathologie.

## **2) Traitement spécifique de l'HTAP**

### **➤ Les prostanoides**

Trois molécules sont disponibles dans ce groupe : la prostacycline injectable ou époprosténol (Flolan<sup>®</sup>), le tréprostinil administré en sous-cutané (Remodulin<sup>®</sup>) et l'iloprost (Ventavis<sup>®</sup>) administrable par voie inhalée. Le Flolan a l'AMM dans les formes les plus sévères d'HTAP idiopathique, héritable, associée à une connectivite ou à la prise d'anorexigènes (classe III ou IV de la NYHA). C'est le seul traitement qui a montré une amélioration de la survie des patients (Ivy 2012). La nécessité d'un cathéter veineux central à demeure et la faible stabilité du produit rendent son maniement complexe et contraignant pour le patient. Des analogues stables de la prostacycline administrables par voies sous-cutanée ou inhalée ont donc été développés. Le Remodulin<sup>®</sup> a l'AMM pour les HTAPI et héritaires en classe III de la NYHA. Les douleurs au point d'injection représentent la complication la plus fréquente et peuvent conduire à l'arrêt du traitement. D'autres formes d'administration de cette molécule sont autorisées par la FDA, la voie IV et l'inhalation. Le Ventavis<sup>®</sup> est indiqué dans les mêmes formes d'HTAP que le Remodulin<sup>®</sup>. La demi-vie courte de ce produit nécessite 6 à 9 inhalations par jour, limitant une bonne observance des patients. La toux et les signes de vasodilatation sont les principaux effets secondaires du produit.

### **➤ Les inhibiteurs des canaux calciques**

L'implication de l'hypertrophie, l'hyperplasie et la vasoconstriction des CML dans le développement de l'HTAPI a conduit dès les années 80 à l'utilisation de vasodilatateurs tels que les inhibiteurs des canaux calciques. Ceux-ci ne semblent cependant efficaces que chez les patients répondeurs au test de vasodilatation réalisé au cours du cathétérisme cardiaque droit. Peu de patients ayant développé une HTAPI sont répondeurs, leur utilisation a donc diminué avec l'arrivée des nouveaux traitements (Galie 2009).

### ➤ **Les antagonistes des récepteurs de l'ET-1**

#### Antagonistes non sélectifs

Le traitement peut inclure le bosentan (Tracleer®) par voie orale. Il a reçu l'AMM pour l'HTAPI, héritable, associée à une connectivite ou un syndrome d'Eisenmenger en classe II ou III. Il est bien toléré hormis le risque de cytolyse hépatique, réversible à l'arrêt du traitement. Une nouvelle molécule, le macitentan, est en étude de phase III (Ivy 2012).

#### Antagonistes sélectifs des récepteurs ET-A

Ces antagonistes, représentés par le sitaxsentan (Thelin®) et l'ambrisentan (Volibris®), présentent l'avantage théorique d'un blocage sélectif des récepteurs ET-A situés sur les CML et responsables d'une vasoconstriction tout en maintenant la liaison aux récepteurs ET-B, situés sur les CE et responsables d'une vasodilatation et de la clairance de l'ET-1. Le Volibris® a l'AMM pour l'HTAP en classe II ou III.

### ➤ **Les inhibiteurs de PDE de type 5**

Le sildénafil (Revatio®) est administré 3 fois par jour par voie orale et est indiqué dans l'HTAP de classe III. Le tadalafil (Adcirca®) a une demi-vie plus longue permettant une administration quotidienne. Il est indiqué dans l'HTAP de classe II et III.

### ➤ **L'atrioseptostomie**

Elle permet de créer un shunt droit-gauche et diminue ainsi la pression ventriculaire droite (Montani 2005). Cette pratique est basée sur l'observation d'un meilleur pronostic chez les patients présentant un syndrome d'Eisenmenger par rapport aux HTAPI. Cette technique serait utilisée chez les patients dont l'état s'aggrave malgré un traitement médical maximal.

### ➤ **La transplantation**

La transplantation coeur-poumons, mono- ou bipulmonaire est indiquée chez les patients les plus graves ne bénéficiant pas ou échappant au traitement médical optimal. Elle est réservée aux sujets de moins de 55 ans.

### ➤ **Stratégie thérapeutique**

Les monothérapies actuelles ciblent des voies distinctes de la dysfonction endothéliale. Plusieurs études en ouvert suggèrent que l'association de ces molécules pourrait permettre l'obtention d'un effet thérapeutique synergique (Sanchez 2010). Ces associations sont

actuellement utilisées en cas d'échec de la monothérapie. Cependant, le choix de la combinaison thérapeutique et le moment optimal pour la débiter restent à déterminer. Des algorithmes pour le traitement des patients adultes et pédiatriques ont été proposés dans les recommandations de l'ERS (European Respiratory Society) et l'ESC (European Society of Cardiology) publiées en 2009 (Galie 2009). Cette combinaison thérapeutique doit être instituée dans un centre spécialisée.

L'inhibition du remodelage des vaisseaux pulmonaires est une nouvelle cible thérapeutique de même que de nouvelles molécules contrebalançant la dysfonction endothéliale sont en cours d'étude.

## **V) Le vieillissement endothélial**

Le vieillissement est un facteur de risque majeur de maladies cardiovasculaires (MCV) qui restent, malgré les avancées de la médecine, la première cause de morbidité et de mortalité dans les pays développés. L'endothélium régule la coagulation, le tonus vasculaire, la perméabilité, la croissance vasculaire et l'inflammation. Ainsi il joue un rôle capital dans le maintien de l'homéostasie cardiovasculaire. Une des caractéristiques du vieillissement est pourtant le développement d'une dysfonction endothéliale, se manifestant par un déséquilibre entre l'atteinte vasculaire et la réparation. Cependant, les MCV, pour lesquelles l'utilisation de PEC autologues est en cours d'évaluation, touchent principalement la population âgée. Il est donc indispensable de comprendre les effets de l'âge sur les processus de revascularisation. L'endothélium étant l'objet de notre étude, les autres caractéristiques du vieillissement telles que l'inflammation ne seront pas détaillées.

La compréhension des mécanismes impliqués dans le vieillissement vasculaire et dans sa prise en charge s'est basée sur les observations faites chez les rongeurs et les primates non humains, le remodelage des parois vasculaires avec le vieillissement étant très proche de celui de l'homme (Lakatta 2003).

### **V.1 Altérations structurales liées au vieillissement**

Ces modifications ne sont pas homogènes sur l'ensemble du réseau vasculaire, mais concernent préférentiellement les gros vaisseaux de distribution. Elles sont responsables de la rigidification des artères.

## **1) Modifications structurales**

Macroscopiquement, l'épaississement pariétal (intimal surtout) et la dilatation des grosses artères élastiques sont les changements structuraux principaux observés avec le vieillissement (Lakatta and Levy 2003). Dans l'étude BLSA (Baltimore Longitudinal Study on Aging), l'épaisseur intima-media (EIM) triple entre les âges de 20 ans et 90 ans (Fleg 1995). La lumière vasculaire s'élargit de 9% environ tous les 10 ans dans l'aorte entre les âges de 20 ans et 60 ans (Karavidas 2010).

Au niveau microscopique, les CE sont plus grandes et irrégulières. L'espace subendothélial est infiltré de CML hypertrophiques, de macrophages et de dépôts de collagène. La matrice extracellulaire (MEC) se densifie et devient riche en glycosaminoglycanes. La production accrue d'enzymes de dégradation de la matrice par les CML activées serait à l'origine d'une hyperperméabilité de la paroi vasculaire, facilitant la transmigration des cellules jusqu'à la couche intimale. De plus, la réponse des CML aux facteurs de croissance serait accrue en termes de chimiotactisme et de prolifération. En parallèle, il y a une diminution des fibres d'élastine qui se fragmentent et se calcifient. Le ratio collagène/élastine qui définit la rigidité artérielle est normalement stable et maintenu par un processus lent mais dynamique de production et dégradation de ces molécules. Sous l'influence d'un milieu inflammatoire ou d'une augmentation de la pression endovasculaire, l'équilibre est rompu en faveur de la production excessive de collagène. La croissance néo-intimale en réponse à une lésion est augmentée avec l'âge en lien avec des facteurs intrinsèques à la paroi vasculaire. Une augmentation des métalloprotéases matricielles, du TGF- $\beta$  (Transforming growth factor beta), des molécules d'adhésion intra-cellulaires et des cytokines a en effet été décrite avec le vieillissement (Zieman 2005). L'enzyme de conversion de l'angiotensine semble plus active chez les animaux âgés, augmentant ainsi la concentration d'angiotensine au niveau du vaisseau, qui stimule l'expression du TGF- $\beta$ . L'activité anti-proliférative du TGF- $\beta$  diminue et il favorise la production de protéines matricielles comme le collagène et la fibronectine.

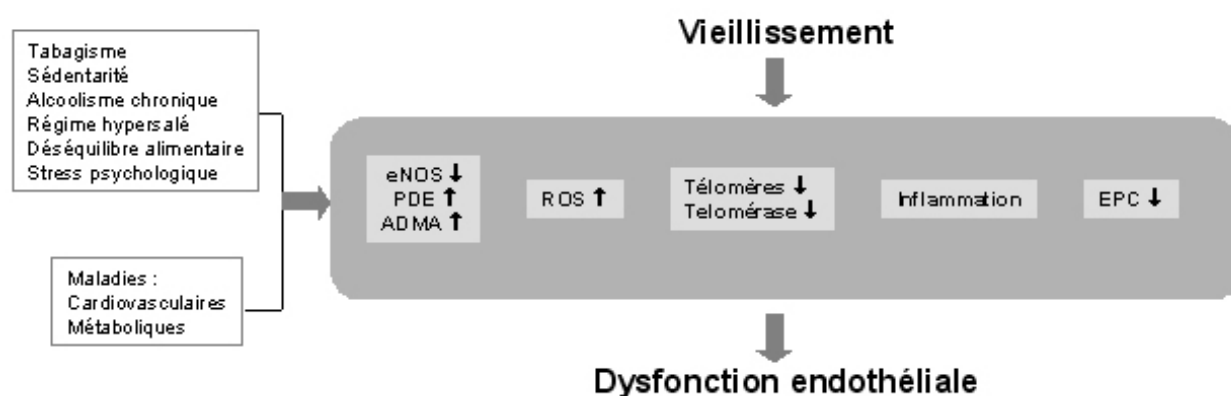
## **2) Augmentation de la rigidité artérielle**

L'augmentation de la rigidité artérielle est similaire entre les hommes et les femmes avec quand même une rigidité un peu plus faible chez les femmes pour un même âge, lié aux effets des hormones sexuelles (Vlachopoulos 2006). L'augmentation de l'EIM avec l'âge

s'accompagne d'une réduction de la compliance et de l'élasticité, et donc d'une augmentation de la VOP (Vaitkevicius 1993). Tout ceci conduit à un retour plus rapide de l'onde réfléchie et donc à une augmentation de la pression artérielle systolique, surtout à partir de 60 ans (Lakatta and Levy 2003). La charge ventriculaire gauche s'en trouve augmentée, ce qui prédispose à une perturbation de l'équilibre entre les besoins et l'apport en oxygène au niveau myocardique. La pression artérielle diastolique augmente jusqu'à 50 ans puis diminue lentement, résultant ainsi en une augmentation de la pression différentielle vers les 60-70 ans, qui met en péril l'intégrité de la paroi vasculaire (Lakatta and Levy 2003).

## V.2 Dysfonction endothéliale

La dysfonction endothéliale est une caractéristique du vieillissement vasculaire qui se traduit principalement par une altération de ses fonctions vasomotrices, comme le montre l'altération de la réactivité endothéliale. La baisse de production et de la biodisponibilité du NO entraîne une vasoconstriction et un stress oxydant. De plus, le vieillissement accroît la sensibilité des CE aux stimuli apoptotiques, altère le processus angiogénique avec une diminution du nombre et de la fonctionnalité des PEC. La perméabilité accrue de l'endothélium ne lui permet plus d'assurer son rôle de barrière. La **figure 11** résume les principaux mécanismes à l'origine de la dysfonction endothéliale observée au cours du vieillissement.



**Figure 11 : Principaux mécanismes à l'origine de la dysfonction endothéliale observée au cours du vieillissement. (Adapté de Toda 2012)**

## **1) Altération de la réactivité endothéliale**

Parmi toutes les fonctions assurées par l'endothélium, la dysfonction endothéliale liée au vieillissement se traduit surtout par une altération de ses fonctions vasomotrices. Plusieurs études cliniques ont montré une diminution de la vasodilatation dépendante de l'endothélium avec l'âge, que ce soit au niveau des artères coronariennes (Egashira 1993) ou des artères brachiales (Celermajer 1994; Taddei 1995; Chauhan 1996; Gerhard 1996; Singh 2002; Gates 2007). La dysfonction du système du NO est la plus précoce avec le vieillissement. Toutefois, l'équipe de Wray et al a comparé les FMD de sujets jeunes (21 ans) et de sujets âgés (71 ans) (Wray 2006). Après normalisation par rapport au delta des contraintes de cisaillement avant et après occlusion, les deux populations présentaient des réponses similaires. La diminution apparente de la FMD avec l'âge pourrait au moins en partie être due à une hyperhémie post-occlusion plus faible et non uniquement une diminution de la capacité de réponse vasculaire. L'amélioration de la fonction vasculaire dans les membres distaux après des exercices suggère la conservation de la plasticité vasculaire avec l'âge.

## **2) Diminution de la biodisponibilité du NO**

La baisse de la biodisponibilité du NO avec l'âge serait associée à une diminution de l'expression de la eNOS. Elle est habituellement induite par les contraintes de cisaillement, ce qui explique que l'exercice régulier améliore la fonction endothéliale chez les sujets âgés. D'autres facteurs régulent sa production, comme les estrogènes, des facteurs de croissance et le peroxyde d'hydrogène. Mais la sécrétion de ces facteurs de croissance et des hormones diminuent avec l'âge.

Pour rappel, le NO est un vasodilatateur, inhibiteur de l'adhésion leucocytaire, de l'agrégation plaquettaire et de la prolifération des CML. C'est aussi un antioxydant par sa capacité à terminer les chaînes de réaction de peroxydation des lipides. Mais il peut être pro-oxydant par formation de peroxynitrite ( $\text{ONOO}^-$ ) avec les anions superoxyde ( $\text{O}_2^-$ ). La diminution du NO limite ainsi la vasodilatation dépendante du flux et la formation de vaisseaux collatéraux (diminue l'angiogenèse) et induit d'un stress oxydant et la migration de cellules de l'inflammation.



### **3) Le stress oxydant**

Divers systèmes enzymatiques produisent des espèces réactives de l'oxygène (ROS) dans les vaisseaux, dont la NOS, la xanthine oxydase et la NADPH oxydase au niveau de l'endothélium vasculaire qui est lui-même une source importante de ROS. Les mécanismes anti-oxydants de maintien cellulaire comprennent la superoxyde dismutase (SOD) qui catalyse la dismutation de l'O<sub>2</sub><sup>-</sup> en peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), la catalase (qui dégrade H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en eau et oxygène) et la glutathion peroxydase (GPx) qui dégrade le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en eau. La GPx est la principale défense anti-oxydante dans les CE (Thorin-Trescases 2010).

La diminution de l'expression de la eNOS et de la production de NO, ainsi qu'une augmentation de la formation d'anions superoxyde conduisent à la génération de peroxy-nitrite et à l'inactivation d'enzymes anti-oxydantes (Brandes 2005). Inversement, l'expression de la NOS inducible (iNOS) par les CML, sous le contrôle du NFκB et des cytokines inflammatoires, est augmentée chez le rat âgé. Le vieillissement semble en effet associé à un profil d'expression de gènes proinflammatoires. L'augmentation de l'activité de la iNOS contribue au développement du stress oxydant par la production de peroxy-nitrite, très fort agent oxydant, à partir du NO et des anions superoxyde.

Le stress oxydant conduit à une sénescence cellulaire donc une diminution des capacités prolifératives et une altération de la fonction endothéliale. La production excessive de ROS par les NADPH oxydases inhibe la prolifération endothéliale. Pourtant en quantité plus limitée, les ROS sont nécessaires à l'induction de l'angiogenèse par le VEGF. Tous les FRCV sont associés à une augmentation du stress oxydant. De ce fait, les dommages moléculaires sont souvent utilisés comme biomarqueurs du vieillissement. Mais la théorie des radicaux libres ne peut à elle seule expliquer le processus complexe du vieillissement.

### **4) La sénescence**

On observe également une augmentation de la sénescence dans les CE avec l'âge. La sénescence correspond à un état d'arrêt de croissance cellulaire, les cellules sont métaboliquement actives mais morphologiquement altérées. En conditions normales, les CE ont un taux de renouvellement estimé à 3 ans. La prolifération endothéliale est initiée lors de lésions endothéliales, de blessure ou d'angiogenèse. Des altérations de ces processus ont d'ailleurs été observées chez les sujets âgés et attribuées à la sénescence endothéliale. Un index de la sénescence est la longueur des télomères, critiques pour l'intégrité

chromosomique. A chaque réplication d'ADN, 50 à 200 paires de base ne sont pas répliquées. Les CE situées à des sites exposés à de fortes contraintes de cisaillement ont des longueurs de télomères réduites, reflet de cycles de division répétés. En dessous d'une certaine longueur de télomères, la cellule atteint le stade de sénescence dite répllicative, avec activation des enzymes inhibitrices du cycle cellulaire comme la p21 et la p53 (Kappei and Londono-Vallejo 2008). Des études ont montré que la longueur des télomères de certains types de cellules humaines diminuait parallèlement à l'augmentation du nombre de mitoses effectuées et à l'âge chronologique des individus (Kappei and Londono-Vallejo 2008). Cette sénescence peut être évitée grâce à la TERT (telomerase reverse transcriptase) habituellement exprimée dans les cellules souches et les cellules cancéreuses. Elle est exprimée dans les CE en culture sous l'effet du NO mais est exportée du noyau lors d'une production importante de radicaux libres. Son expression dans les CE et les CML vasculaires diminue avec l'âge (Minamino 2004).

Le phénotype de sénescence cellulaire peut aussi être induit par des dommages de l'ADN, un stress cellulaire ou une activation oncogénique (p53, p21), indépendamment de la longueur des télomères (Minamino 2004). Cet état est alors qualifié de sénescence induite prématurément par le stress (SIPS) (Kappei and Londono-Vallejo 2008). Elle passe par la cavéoline-1, la voie de ERK1/2 (extracellular signal regulated kinases 1 and 2) et celle de la p38 MAPK (mitogen activated protein kinase) qui active également les protéines inhibitrices du cycle cellulaire. (Brandes 2005)

Dans les conditions pathologiques telles que les MCV, la sénescence s'avèrerait plutôt être une réponse précoce au stress avec des composantes des voies répllicative et SIPS (Thorin-Trescases 2010). L'apparition de la sénescence dans les CE corrèle avec la durée d'exposition aux FRCV mais pas à l'âge physiologique des individus.

Des altérations fonctionnelles ont été décrites dans les CE sénescents comme la diminution de l'expression de la eNOS et l'augmentation de l'expression de molécules pro-inflammatoires. Le vieillissement entraîne la sénescence des PEC aussi bien que des CE (Kushner 2009), expliquant ainsi l'altération de leurs fonctions et la diminution de l'angiogenèse et de la réparation vasculaire.

## 5) La réparation endothéliale

### 5.1 Altération de la néovascularisation

L'équipe de Edelberg a montré l'effet de l'âge sur les capacités de néovascularisation des ECFC dans un modèle de transplantation cardiaque de souris âgées (Edelberg 2002). Seule l'injection de cellules dérivées de la MO de jeunes souris restaurait la vascularisation cardiaque, comparées à celles issues de souris âgées. Chez l'homme, les patients âgés présentent un défaut d'angiogenèse se manifestant notamment par une diminution de la densité capillaire et une réponse angiogénique diminuée face à l'hypoxie (Lahtenvuo and Rosenzweig 2012).

Ces résultats témoignent d'une altération de l'angiogenèse dépendante de l'âge. Plusieurs mécanismes de l'altération de la réparation endothéliale ont été évoqués (Dimmeler 2003): une mobilisation diminuée comme pour les CSH (Povsic 2010), une survie ou une différenciation diminuée car les FR altèrent la biodisponibilité du NO et augmente la sénescence des cellules.

### 5.2 PEC et vieillissement

#### ➤ Etudes observationnelles

Plusieurs études ont décrit une diminution du nombre de PEC avec l'âge, ainsi que leur fonction (**Tableau VIII**). Mais aucune donnée n'existe à ce jour sur la quantification des CFU-EC et des ECFC selon l'âge, qui fait l'objet d'un des travaux réalisés dans cette thèse. Il est à signaler que la définition des PEC utilisée dans ces études est hétérogène, allant de cellules CD34+ (Tao 2006) aux PEC précoces (Hoetzer 2007). Une étude réalisée chez des patients souffrant d'ischémie critique a montré une diminution du nombre de PEC précoces au repos et après transfert du gène du VEGF chez les patients âgés (5 fois moins que chez les jeunes) (Kalka 2000). Scheubel et al ont montré une diminution du taux de base des cellules CD34+CD133+, et du VEGF plasmatique avec l'âge chez des patients coronariens âgés de 43 à 90 ans (Scheubel 2003). De plus, ils ont décrit une moindre mobilisation de ces cellules après pontage aorto-coronarien chez les patients plus âgés (Scheubel 2003). L'équipe de Tao et al a montré une diminution des cellules CD34+ (appelées PEC dans la publication), en parallèle de la perte d'élasticité (VOP), avec le vieillissement chez des sujets sains (26 sujets âgés de 20 à 30 ans versus 30 sujets âgés de 60 à 70 ans) (Tao 2006). Thijssen et al ont comparé deux populations de sujets sains d'âge différent (67-76 ans versus 19-28 ans) et ont

montré une diminution des cellules CD34+CD45dim, soit des CSH, et des PEC (cellules CD34+KDR+, dans la fenêtre lymphocytaire) mesurées par cytométrie en flux avec le vieillissement (Thijssen 2006). Une diminution du nombre de PEC précoces a été décrite à partir d'un âge moyen ainsi que leur capacité de migration chez les sujets plus vieux (Hoetzer 2007).

D'autres études ont montré une augmentation des PEC (**Tableau VIII**). Shaffer et al retrouvent la diminution du nombre de progéniteurs circulants (définis comme CD34+, CD133+, et CD34+CD133+) avec l'âge chez des sujets sains (33 ans versus 66 ans). Mais aucune différence n'est rapportée pour les PEC pour lesquels plusieurs définitions cytométriques ont été utilisées incluant toutes le marqueur KDR, ni pour les CFU-EC (Endocult), ni des CE matures (CF) (Shaffer 2006). Heiss et al ont montré une diminution de la FMD mais pas du nombre de PEC (CD34+KDR+ quantifiés parmi les CMN) chez des sujets sains sans FRCV (environ 60 ans versus 25 ans) (Heiss 2005). Une diminution de la survie, de la prolifération et de la migration des PEC précoces avec l'âge a également été décrite avec une corrélation entre la FMD et les capacités de prolifération et de migration (Heiss 2005). L'équipe de Pellicia et al n'a pas montré de différence dans le nombre de PEC CD34+ ou CD133+ et CD105+ mesurés dans la fraction des CMN de patients coronariens que ce soit en fonction de l'âge ou de la maladie (Pelliccia 2009).

**Tableau VIII : Résumé des résultats de l'étude des cellules progénitrices dans le vieillissement**

Type cellulaire	Technique	Nombre	Activité	Pathologie	Références
CFU-EC (CAC)	culture cellulaire	diminution		Ischémie critique	Kalka 2000
CD34+CD133+	CF-sang total	diminution	mobilisation diminuée après pontage	maladie coronarienne	Scheubel 2003
VEGF	-	diminution			
CD34+	CF-sang total	diminution		sujets sains	Tao 2006
CD34+CD45dim	CF-sang total	diminution	mobilisation diminuée après exercice NS après exercice, et pas mobilisation	sujets sains	Thijssen 2006
CD34+KDR+	CF-sang total	diminution			
VEGF	-	augmentation			
CFU-Hill	culture cellulaire	diminution	diminution	sujets sains	Hoetzer 2007
CD34+, CD133+	CF-sang total	diminution		sujets sains	Shaffer 2006
CD34+CD133+	CF-sang total	diminution			
KDR+...	-	NS			
CFU-Hill	culture cellulaire	NS			
CD34+KDR+	CF-CMN	NS		sujets sains	Heiss 2005
CD34+CD133+	CF-CMN	NS			
CAC	-	-	diminution survie, prolifération, migration		
VEGF	-	augmentation			
CD34+CD105+	CF-CMN	NS		maladie coronarienne	Pellicia 2009
CD133+CD105+	CF-CMN	NS			

La variété dans les définitions phénotypiques utilisées pour qualifier les PEC ainsi que dans les méthodes de quantification est certainement à l'origine des discordances entre ces différentes études. On retrouve dans l'ensemble une diminution des cellules progénitrices et une diminution des fonctions des PEC. Les discordances portent surtout sur la quantification des PEC. Les modifications fonctionnelles plus que les modifications numériques de certaines cellules progénitrices vasculaires seraient responsables de la dysfonction endothéliale avec le vieillissement (Heiss 2005). D'autres études sont nécessaires avec des groupes mieux définis en terme d'âge, de sexe, de statut hormonal et de facteurs de risque cardiovasculaires pour déterminer si le vieillissement affecte le nombre et la fonctionnalité des PEC.

### ➤ **Altération de la mobilisation des PEC**

En ce qui concerne les CSH, leur diminution dans la circulation avec le vieillissement est liée à un défaut de mobilisation et non d'épuisement médullaire (Povsic 2010). Quelques

études ont également montré une altération de la mobilisation des cellules progénitrices (Scheubel 2003; Thijssen 2006). Les essais cliniques ont également montré une diminution de réponse aux facteurs angiogéniques extrinsèques qui pourrait s'expliquer par l'âge avancé des patients (Gupta 2009).

L'altération de la mobilisation des PEC par le VEGF contribue certainement au déficit de vascularisation post-natale associée au vieillissement. La diminution de la production de facteurs de croissance ainsi que celle de la réactivité endothéliale à ces facteurs spécifiques seraient responsables du retard d'angiogenèse au niveau de la blessure dans les souris âgées (Swift 1999). Un retard de néovascularisation a été observé chez les souris et les lapins âgés, apparemment en lien avec une moindre expression tissulaire du VEGF dans les membres ischémiés (Rivard 1999). Une étude chez le lapin a montré que la diminution de l'expression du VEGF associée au vieillissement serait liée à une diminution de l'activité de HIF-1 (Rivard 2000). Une augmentation moindre du VEGF plasmatique a été associée à une mobilisation moins importante des PEC chez des patients âgés lors d'un pontage coronarien (Scheubel 2003). On observe également une diminution de l'expression du VEGF-A chez l'homme âgé, que ce soit en taux basal ou après une ischémie (Lahtenvuo and Rosenzweig 2012). Une analyse moléculaire des gènes impliqués dans la néovascularisation en réponse à l'ischémie a été réalisée dans un contexte de vieillissement chez la souris (Wang 2011). L'expression de la MMP-9, de HIF-1 $\alpha$  et du SDF-1 en phase aiguë de l'ischémie était plus importante dans les souris âgées, mais retardée, en faveur d'une ischémie plus prononcée chez les souris âgées. A l'inverse, le VEGF et la eNOS étaient moins exprimés chez les souris âgées, et le CD133 était plus exprimé au niveau médullaire. Ces résultats suggèrent une altération de la mobilisation des cellules progénitrices au site ischémié avec une réponse retardée. Le vieillissement diminue la stabilisation de HIF1 $\alpha$  dans les tissus ischémiques (Chang 2007). D'autres voies impliquant le PDGF (platelet-derived growth factor) ou le bFGF (basic fibroblast growth factor) sont également dysfonctionnelles dans les cellules sénescents (Lahtenvuo and Rosenzweig 2012). De plus, l'activité des facteurs de croissance nécessaires à la prolifération endothéliale et l'angiogenèse est modulée par les protéines glyquées (ou produits de glycation avancée), dont la concentration augmente avec le vieillissement (Lakatta 2003). Ces données suggèrent que l'altération de la néovascularisation semble provenir d'un défaut de réponse du tissu âgé à l'hypoxie plutôt que d'un défaut intrinsèque de la fonction des PEC.

Cependant, des résultats contradictoires ont été observés dans d'autres études. Une augmentation du VEGF a été décrite en parallèle de l'altération des capacités angiogéniques

des CFU-EC, suggérant un mécanisme de mobilisation compensatoire (Heiss 2005). Une autre étude a montré que les sujets âgés présentaient une augmentation du VEGF (Thijssen 2006). Mais une mobilisation moins importante des CSH lors d'un exercice intense a été observée.

### ➤ Apoptose des PEC

En parallèle de l'environnement pro-oxydant qui se développe avec l'âge, un déclin de la défense anti-oxydante a été décrit chez les CFU-EC de sujets sains âgés sans FRCV. Les PEC sont vulnérables face à la sénescence prématurée induite par des stimuli proinflammatoires (Zhang 2009). La diminution de la capacité de survie dans des situations de stress serait liée à une diminution de l'expression et de l'activité de la GPx-1 (He 2009).

L'environnement pro-inflammatoire induit la différenciation des cellules monocytiques en cellules inflammatoires et non en CE (Dimmeler and Zeiher 2004). On observe aussi une activation des protéases dans un contexte inflammatoire, responsable du clivage de récepteurs de surface et de la dérégulation des cascades de signalisation intracellulaires (Dimmeler 2003). De plus, le profil d'expression de gènes des CE semble modifié dans un sens anti-angiogénique avec notamment la diminution d'expression d'ICAM-1 en cas d'inflammation, l'augmentation de la production d'un inhibiteur de métalloprotéases ce qui limiterait la dégradation matricielle, nécessaire au procédé d'angiogenèse, la diminution de l'expression de facteurs angiogéniques comme le VEGF et le TGFβ1, avec en parallèle augmentation des facteurs anti-angiogéniques comme la thrombospondine 2. La concentration d'ET-1, agent vasoconstricteur, augmente également avec l'âge, et la réactivité vasculaire à ce peptide diminue.

Plusieurs voies sont impliquées dans la formation de nouveaux vaisseaux et des différences importantes doivent exister selon le contexte à l'origine de l'angiogenèse. Ceci pourrait expliquer pourquoi la dysfonction de l'angiogenèse chez le sujet âgé n'est observée que dans certains contextes, comme la réponse à l'ischémie ou à l'infarctus mais pas à l'exercice physique (Lahteenhuo and Rosenzweig 2012). Certaines études ont montré que l'endothélium régénéré était dysfonctionnel (chez le lapin). Les maladies cardiovasculaires et métaboliques, comme l'hypertension et le diabète, accentuent ces changements dépendants de l'âge dans les PEC et accélèrent leur sénescence.

Peu d'études se sont intéressées à l'évolution des marqueurs de lésion ou d'activation endothéliale, bien que le développement d'une dysfonction endothéliale au cours du

vieillissement ait été démontré. Les sujets âgés présentent souvent des FRCV, eux aussi à l'origine d'une dysfonction endothéliale. L'étude spécifique de l'impact du vieillissement sur l'endothélium nécessite le recrutement de sujets sains, qui s'avère de plus en plus difficile avec l'augmentation de l'âge.



# TRAVAUX

## I) Objectifs du travail

Il est clairement établi que la dysfonction endothéliale joue un rôle important dans de nombreuses situations pathologiques. La description de populations endothéliales circulantes, biomarqueurs de l'intégrité endothéliale, permet un accès facile à l'endothélium dont l'étude a longtemps été limitée par la nécessité d'utiliser des méthodes invasives pour son exploration. On distingue des marqueurs de lésion ou d'activation endothéliale comme les CEC et les MPE et des marqueurs de régénération comme les PEC. Nous nous sommes intéressés à l'étude de ce compartiment endothélial circulant dans deux contextes : d'une part dans un contexte pathologique, l'hypertension artérielle pulmonaire (HTAP), afin de déterminer l'intérêt diagnostique et pronostique de ces marqueurs, et d'autre part dans l'optique du développement d'un produit de thérapie cellulaire à partir de PEC autologues.

La dysfonction endothéliale est, en effet, un élément central du développement de l'HTAP. Le compartiment endothélial circulant comprenant les CEC et les PEC a fait l'objet d'une première étude dans une cohorte pédiatrique de patients souffrant d'HTAP secondaire à une cardiopathie congénitale. Une deuxième étude a été réalisée chez des adultes, comparant plusieurs formes d'HTP. Dans ces deux études, nous avons quantifié les CEC et les PEC dans le sang périphérique et au niveau du site principal de la pathologie, l'artère pulmonaire. Enfin, le versant thérapeutique de l'HTAP a été abordé par l'étude des effets des prostanoïdes sur les cellules impliquées dans la réparation endothéliale des patients.

La deuxième partie de ces travaux s'intègre dans un projet plus large d'utilisation des PEC comme produit de thérapie cellulaire autologue. Il a en effet été démontré que l'injection de CMN dans certaines pathologies ischémiques apportait un bénéfice, bien que moindre par rapport aux études chez l'animal. Des populations distinctes de PEC ont été décrites dont les ECFC, seules cellules présentant les caractéristiques de véritables progéniteurs. Elles peuvent être amplifiées en culture cellulaire mais sont des événements rares dans le sang circulant. En se basant sur la mise en évidence de cellules progénitrices endothéliales dans le mur vasculaire (cf §III.2.3), nous avons testé l'impact d'un procédé d'hypoxie locale sur leur mobilisation médullaire ou endothéliale dans la circulation systémique. Compte-tenu de l'hétérogénéité des méthodes de culture utilisées, une étape d'optimisation de l'isolement des ECFC a été réalisée avant le début de cette étude. Une grande majorité des patients concernés par l'utilisation des PEC autologues sont ceux souffrant de maladies

cardiovasculaires, population majoritairement âgée. Nous avons donc évalué en parallèle l'impact de la dysfonction endothéliale associée au vieillissement sur ce procédé. Ainsi, la globalité du compartiment endothélial circulant (CEC, MPE et PEC) a été explorée à l'état basal et lors du procédé d'hypoxie locale dans deux groupes d'âge de volontaires sains.

## **II) Compartiment endothélial circulant et HTAP**

### **II.1 Population pédiatrique**

#### **1) Résumé**

La dysfonction endothéliale joue un rôle important dans le développement de l'HTAP. Nous nous sommes intéressés au compartiment endothélial circulant dans cette pathologie. L'étude réalisée dans la population pédiatrique concerne plus spécifiquement l'HTAP secondaire aux cardiopathies congénitales, deuxième cause à l'origine du développement des formes progressives d'HTP chez l'enfant. La prise en charge thérapeutique dépend du stade de la pathologie, la chirurgie étant contre-indiquée dans les cas de formes irréversibles, l'évolution vers le syndrome d'Eisenmenger étant de meilleur pronostic dans ce cas. La détermination du stade est actuellement basée sur les examens cliniques et les critères hémodynamiques. Dans certains cas, il n'existe pas de méthode suffisamment sensible ou spécifique pour déterminer le caractère réversible de la pathologie avec la chirurgie. La recherche de marqueurs facilement accessibles pour aider à déterminer la réversibilité de la pathologie est donc essentielle pour améliorer la prise en charge de ces patients, souvent très jeunes. Lévy et al ont décrit, dans des biopsies pulmonaires, la présence de lésions plexiformes spécifiquement dans les formes irréversibles d'HTAP secondaire aux cardiopathies congénitales, une résistance à l'apoptose des CE et des signes de néoangiogenèse compensatoire. Nous avons donc étudié le compartiment endothélial circulant comme reflet des lésions vasculaires et de la présence de mécanismes de réparation endothéliale dans cette pathologie. Dans une population pédiatrique de 31 patients souffrant d'HTAP secondaire aux cardiopathies congénitales, les CEC et les cellules progénitrices circulantes (CPC, CD34+CD133+) ont été quantifiées dans trois sites de prélèvement différents : l'artère pulmonaire, la veine pulmonaire et la circulation systémique. C'est la première étude comparant le sang périphérique et le site pulmonaire. Les taux de ces marqueurs dans le sang périphérique n'étaient pas différents de ceux des sites veineux et artériels pulmonaires, permettant ainsi de proposer une quantification de ces cellules de manière moins invasive par un simple prélèvement de sang périphérique. Cette étude a montré que le nombre de CEC serait un marqueur non invasif

d'irréversibilité de l'HTAP secondaire aux cardiopathies congénitales (57 [12;166] CEC/ml dans les formes classées irréversibles à 6 mois, versus 3 [0;20] pour les formes réversibles, et 3 [1;8] pour les contrôles  $p < 0,05$ ). Les CEC n'étaient pas corrélées à la PAP. Elles seraient ainsi le témoin de lésions histopathologiques présentes seulement dans certains types d'HTP et non le reflet de la sévérité hémodynamique de la maladie. La quantification des CEC pourrait alors contribuer à la détermination du stade des HTAP secondaires aux cardiopathies congénitales et à l'orientation thérapeutique pour la prise en charge des patients.

En l'absence de méthode standardisée pour la quantification des PEC et d'une quantité suffisante de sang prélevé, l'évaluation de la régénération vasculaire a été réalisée indirectement par la mesure des CPC, ne montrant pas de mobilisation de ces cellules chez les patients par rapport aux contrôles. Ce résultat, accompagné de l'absence de différence dans les niveaux des marqueurs plasmatiques d'angiogenèse et d'inflammation, n'est pas en faveur d'une origine systémique des progéniteurs dans l'angiogenèse décrite par Lévy et al au sein des vaisseaux pulmonaires des formes irréversibles. Ces résultats doivent cependant être confirmés dans une plus grande cohorte de patients et avec un suivi à long terme. La quantification des PEC et l'étude de leur fonctionnalité doit également être envisagée ainsi que l'étude de l'origine des CEC : CE apoptotiques provenant des lésions ou témoin de la formation de nouveaux vaisseaux.

## 2) Article publié

[Circulating endothelial cells: a new candidate biomarker of irreversible pulmonary hypertension secondary to congenital heart disease.](#)

Smadja DM, Gaussem P, **Mauge L**, Israël-Biet D, Dignat-George F, Peyrard S, Agnoletti G, Vouhé PR, Bonnet D, Lévy M.

Circulation. 2009 Jan 27;119(3):374-81. Epub 2009 Jan 12.

## **II.2 CEC et HTAP : adulte**

### **1) Résumé**

L'étude du compartiment endothélial circulant a été réalisée dans une population adulte présentant des HTP de deux groupes différents : l'HTAP et l'HTP postembolique. La persistance de l'occlusion des vaisseaux par les thrombi dans l'HTP post-embolique peut conduire au développement d'une véritable artériopathie secondaire des petits vaisseaux pulmonaires, les lésions observées sont alors similaires à celles de l'HTAPI. Les patients non opérables seront donc traités par les molécules utilisées dans l'HTAP. Dans une population adulte de 18 patients, 9 HTAP, 9 HTP postemboliques, et 7 contrôles, les CEC, les CPC (CD34+CD133+) et les CFU-Hill ont été quantifiées dans deux sites de prélèvement différents : l'artère pulmonaire et la circulation systémique. C'est la première étude ayant exploré l'intégrité vasculaire dans son ensemble. Comme chez l'enfant, aucune différence de nombre de cellules n'a été observée entre l'artère pulmonaire et le sang périphérique. Malgré des résultats hémodynamiques similaires entre le groupe des HTAP et des HTP postemboliques, seul le groupe des HTAP présente une augmentation des CEC, une élévation des taux plasmatiques de la E-sélectine soluble et du VCAM soluble, en faveur d'une atteinte endothéliale. L'absence de corrélation entre les paramètres hémodynamiques et le nombre de CEC suggère à nouveau que la présence des CEC est plus le reflet du type ou de l'étendue des lésions endothéliales que celui de la sévérité hémodynamique de la maladie. Le mécanisme de détachement des CE reste à déterminer : par l'augmentation des pressions qui sont cependant similaires entre les deux groupes, ou par prolifération cellulaire locale, ou la combinaison des deux. Sur le versant régénération, aucune mobilisation de cellules progénitrices, CPC ou CFU-Hill n'a été observée, en accord avec l'absence d'augmentation du taux de VEGF plasmatique. On ne peut exclure pour autant la participation des progéniteurs endothéliaux au remodelage vasculaire. Ces données doivent être complétées par l'étude des progéniteurs endothéliaux, cellules CD34+CD133+KDR+ et ECFC, tant au niveau quantitatif que qualitatif. Chez trois patients, une diminution des CEC a été observée quelques mois après l'instauration du traitement par bosentan, suggérant un intérêt de la numération de ces cellules dans l'évaluation de l'efficacité des traitements. L'étude du compartiment endothélial circulant au long cours chez les patients sous traitement serait utile pour rechercher un marqueur d'efficacité du traitement et comprendre leurs mécanismes d'action. Ainsi, la suite du travail a consisté en l'étude du secteur de régénération endothélial en fonction du traitement, et notamment des ECFC, chez les enfants (§ II.3).

## 2) Article publié

[Distinct patterns of circulating endothelial cells in pulmonary hypertension.](#)

Smadja DM, **Mauge L**, Sanchez O, Silvestre JS, Guerin C, Godier A, Henno P, Gaussem P, Israël-Biet D.

Eur Respir J. 2010 Dec;36(6):1284-93. Epub 2010 Apr 22.

## **II.3 ECFC et tréprostinil**

### **1) Résumé**

Plusieurs études ont montré une mobilisation de cellules progénitrices au niveau pulmonaire dans les modèles animaux d'HTP (Davie 2004; Satoh 2009). Bien que les résultats de la quantification de ces cellules dans le sang périphérique soient contradictoires (Asosingh 2008; Diller 2008), l'amélioration de l'HTP après transplantation de PEC, que ce soit chez l'animal (Zhao 2005; Raoul 2007) ou chez l'homme (Wang 2007; Zhu 2008) suggère un rôle de ces cellules dans la physiopathologie de cette maladie. De plus, plusieurs études ont montré un effet pro-angiogénique des molécules utilisées dans le traitement de l'HTAP, telles que le bosentan (Iglarz 2001), le sildénafil (Diller 2008) et les prostanoïdes (Buchanan 2004). Mais seul le traitement par prostanoïdes a montré une diminution de la mortalité des patients souffrant d'HTAP (Ivy 2012). Le tréprostinil est un analogue synthétique de la prostacycline administré par voie sous-cutanée, parfois préféré à l'époprosténol d'utilisation plus contraignante et présentant un haut risque d'infection. Ayant démontré que les dosages dans le sang périphérique reflétaient ceux du site pulmonaire, nous avons étudié l'effet du tréprostinil sur la quantité de progéniteurs circulants (CSH, CFU-Hill et ECFC) et les capacités angiogéniques des ECFC à partir du sang périphérique, dans une population pédiatrique de patients ayant développé une HTAPI ou une HTAP secondaire à une cardiopathie congénitale. Avant traitement, on observe une augmentation des CSH dans l'HTAPI seulement, et une augmentation des ECFC dans les HTAP réversibles. Après traitement, seuls les patients ayant reçu du tréprostinil présentent une augmentation du nombre d'ECFC. Ces cellules prolifèrent plus et ont des capacités angiogéniques accrues sous tréprostinil. Ceci est en faveur d'un rôle bénéfique des ECFC. Un effet pro-angiogénique des prostanoïdes a déjà été décrit, impliquant la production de VEGF. Cependant, le mécanisme de contribution exact des ECFC à la néoangiogenèse reste à déterminer. De plus, les résultats obtenus ici avec le tréprostinil doivent être vérifiés avec l'utilisation des autres dérivés de la prostacycline disponibles et comparés aux propriétés d'ECFC isolés chez des sujets contrôles. Une étude a déjà observé une augmentation des CAC chez les patients traités par époprosténol IV. Le lien entre le bénéfice thérapeutique apporté par le tréprostinil et son action sur les ECFC reste à établir avant d'envisager l'utilisation des ECFC en thérapie cellulaire.

## 2) Article publié

[Treprostinil increases the number and angiogenic potential of endothelial progenitor cells in children with pulmonary hypertension.](#)

Smadja DM, **Mauge L**, Gaussem P, d'Audigier C, Israel-Biet D, Celermajer DS, Bonnet D, Lévy M.

Angiogenesis. 2011 Mar;14(1):17-27. Epub 2010 Nov 4.

### **III) Développement d'un produit de thérapie cellulaire**

Face à l'intérêt grandissant que suscite l'utilisation thérapeutique des PEC dans les pathologies cardiovasculaires, notre équipe a participé à un projet de développement d'un produit de thérapie cellulaire de l'ischémie critique, dans lequel s'inscrivent les travaux qui vont suivre.

#### **1) Résumé**

L'implication des PEC dans la réparation vasculaire (Asahara 1999; Takahashi 1999) a ouvert la voie à de nouvelles stratégies thérapeutiques. Une corrélation entre le taux et la dysfonction de ces cellules a été rapportée dans plusieurs études (Martin and Anderson 2009), suggérant un effet protecteur, voir thérapeutique de ces cellules. D'ailleurs, des effets bénéfiques ont été observés suite à l'injection de cellules progénitrices dans les modèles expérimentaux et plusieurs essais cliniques à partir de CMN dérivées de la MO. Parmi les cellules candidates, les ECFC présentent un intérêt comme outil thérapeutique (Yoder 2009), car elles présentent les propriétés de progéniteurs et peuvent ainsi être amplifiées en culture. En raison de leur rareté, leur utilisation nécessite un enrichissement préalable à la culture. En se basant sur la mise en évidence de cellules progénitrices endothéliales dans le mur vasculaire, nous avons évoqué l'hypothèse d'une mobilisation des progéniteurs endothéliaux vasculaires par une épreuve d'ischémie locale de l'avant-bras. La population cible de cette thérapie dans notre projet est celle des patients ayant une ischémie critique, et donc avec un âge moyen avancé. Cependant, le vieillissement, facteur de risque majeur de MCV, est associé à une dysfonction endothéliale (Gates 2007) et une altération des propriétés angiogéniques des PEC (Scheubel 2003; Thijssen 2006). Il pourrait ainsi représenter un frein à l'utilisation de PEC autologues. Ainsi, pour la première fois, l'impact du vieillissement sur la compétence vasculaire dans son ensemble a été exploré, au repos et lors d'une procédure d'ischémie locale. Deux groupes de sujets sains de 2 tranches d'âge ont été comparés (20-30 ans et 60-70 ans). Ce travail a été financé par la Fondation pour la Recherche Médicale et s'intègre dans un projet plus large d'étude de la compétence vasculaire au cours de l'âge.

La diversité des conditions d'ensemencement lors de la culture des ECFC dans les travaux de la littérature nous a conduits dans un premier temps à proposer une optimisation de la méthode, qui a ensuite été validée dans un système de culture cellulaire de grade clinique.

Nous avons observé que la réactivité endothéliale était préservée au cours du vieillissement malgré une augmentation de la rigidité artérielle. A l'état basal, les CSH étaient diminuées avec l'âge,



mais aucune différence concernant les CEC, les MPE ou les PEC n'a été observée. De même, l'évolution du compartiment endothélial circulant secondaire à l'ischémie était semblable. L'ischémie engendrée par le processus d'occlusion n'a pas permis de mobiliser les PEC. Ce résultat peut s'expliquer par une ischémie insuffisante pour engendrer des processus systémiques de mobilisation des PEC, comme le suggère l'absence de libération de MPE et de CEC. L'absence de progéniteurs résidents sur ce site vasculaire, moins sensible à l'athérosclérose (Newcomer 2004) pourrait aussi expliquer l'absence de mobilisation par l'activation endothéliale. Cette procédure a, de plus, conduit à une altération des propriétés angiogéniques des ECFC, dont le mécanisme reste à explorer. L'hypothèse de la libération de facteurs anti-angiogéniques par les plaquettes activées est à explorer.

## **2) Article soumis**

Forearm ischemia decreases endothelial colony-forming cell angiogenic potential without interference of aging

Laetitia Mauge<sup>1,2,3</sup>, Pierre Boutouyrie<sup>1,4,5</sup>, Clément d'Audigier<sup>1,2,3</sup>, Florence Sabatier<sup>6</sup>, Séverine Peyrard<sup>7</sup>, Anne Blanchard<sup>7</sup>, Michel Azizi<sup>7</sup>, Blandine Dizier<sup>2</sup>, Françoise Dignat-George<sup>6</sup>, Pascale Gaussem<sup>1,2,3</sup> and David M. Smadja<sup>1,2,3</sup>

From:

<sup>1</sup> Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cite, Paris, France

<sup>2</sup> Inserm UMR S 765, Faculté de Pharmacie

<sup>3</sup> AP-HP, Hôpital Européen Georges Pompidou, Service d'Hématologie Biologique

<sup>4</sup> AP-HP, Hôpital Européen Georges Pompidou, Service de Pharmacologie Clinique

<sup>5</sup> Inserm UMR S 970, PARCC

<sup>6</sup> Inserm UMR S 602, Université de la Méditerranée, Faculté de Pharmacie, Marseille, France

<sup>7</sup> AP-HP, Hôpital Européen Georges Pompidou, Centre d'Investigations Cliniques 9201

Corresponding author: Dr. David SMADJA

Paris Descartes University, Faculté de  
Pharmacie Hematology Department 4 Avenue  
de l'observatoire, 75006 Paris, France Phone:  
+33 1 56093933; fax: +33 1 56093393 Email:  
david.smadja@egp.aphp.fr

Abstract:

**Objectives :** The description of circulating endothelial progenitor cells (EPCs), involved in postnatal vasculogenesis, suggested their use as a cell therapy product to treat cardiovascular diseases. Vascular wall EPCs mobilization could optimize autologous EPC collect. As aging, a major risk factor of cardiovascular diseases, is associated to vascular impairment, its impact on the efficacy of local ischemia to mobilize EPCs was assessed through the circulating endothelial compartment, which reflects vascular integrity

**Methods and Results:** After optimization of endothelial colony-forming cell (ECFC) culture, different biomarkers of vascular dysfunction was quantified in two groups of healthy volunteers along aging (20-30 year old vs 60-70 year old) at rest and after forearm ischemia (FI). Despite arterial stiffness increase, aging impacted neither endothelial reactivity nor circulating endothelial compartment at rest or after FI. ECFC were associated after ischemia with arterial stiffness, whatever age group. However, FI altered ECFC angiogenic properties properties in vitro and n vivo in hind limb ischemia model recovery.

**Conclusions:** In this study, aging did not impact significantly circulating endothelial compartment including circulating endothelial cells, microparticles and progenitors. However, the procedure of local ischemia such as tested in this study did not allow us to mobilize EPCs and revealed to decrease their angiogenic potential.

**Keywords :** forearm ischemia, aging, endothelial microparticules, circulating endothelial cells, endothelial colony-forming cells

## Introduction

The description of circulating endothelial progenitor cells (EPCs) originating from bone marrow [1] and able of postnatal vasculogenesis [2, 3] has paved the way for new therapeutic strategies using these cells for tissue ischemia as a cell therapy product. On the other side, EPC level and altered function have been shown predictive of cardiovascular events and associated to cardiovascular risk factors [4, 5].

Several types of cells are referred as EPCs according to their phenotype, the method used, or their origin [6]. Cells expressing CD34, CD133 and KDR (VEGF-R2) antigens by flow cytometry are commonly called EPCs [7]. In culture, two types of EPCs have been isolated. Early EPCs, also called CFU-EC, circulating angiogenic cells (CAC) or CFU-Hill, depending on the method of isolation, are spindle-shaped cells that express leukocyte markers, a very low level of endothelial markers and they do not give rise to pseudotubes *in vitro* nor they form human vessels in preclinical models of vascularisation [8]. Late EPC, or endothelial colony-forming cells (ECFCs) according to Yoders group classification, are rare circulating viable cells obtained within one to three weeks of culture that show a robust clonal proliferative potential [8, 9]. They express endothelial markers as well as the embryonic marker BMP4 [10]. These cells, by contrast to CACs, merge into neovessels *in vivo* [8] and are described as true progenitor cells, thus raising a special interest for their development as an autologous cell therapy product to treat ischemic diseases, such as critical limb ischemia. Two main limiting factors hinder such a development in adults: first, ECFCs obtained in culture could have a decreased angiogenic potential along aging [9, 11]. Associated with the decreased circulating level of progenitors and the reported endothelial dysfunction in elderly [12], optimisation of ECFC culture is needed. Second, huge amounts of blood are required to obtain sufficient numbers of cells, and thus an efficient mobilization procedure is needed. Several procedures have thus been considered, as *in vivo* cell mobilization after administration of growth factors [3, 13], *ex vivo* expansion [14] and even gene

therapy [15]. Friedrich et al observed a mobilization of a very immature progenitor cell population CD34-CD133+ under a local ischemia process [16]. Ingram et al. proposed that ECFCs, supposed to be the real endothelial progenitor cell population, could have a vascular origin [17]. So, we then hypothesized that ECFCs could be efficiently mobilized from bone marrow or vascular wall in conditions of a vascular stimulation by local ischemia.

Thus, this study aimed at determining the impact of a forearm ischemia procedure on EPC mobilization along aging. As ECFC culture was not standardized yet, a first part was designed to optimize this technique. Then, two groups of healthy volunteers aged 20- to 30- year old and 60- to 70- year old were included to undergo a functional endothelial evaluation including the measure of flow mediated dilation and of arterial stiffness associated with the quantification of circulating endothelial compartment at different time points after a forearm ischemia.

## Subjects and methods

### I. Optimization of ECFC culture

#### *Cord blood ECFC isolation*

Endothelial Colony Forming Cells were isolated from human umbilical cord blood collected on citrate (CB-ECFCs), with the mothers' consent. The study was approved by the ethics committee of Hopital des Instructions et des Armees de Begin (France) (201008043234797) and the protocol conformed to the Declaration of Helsinki. ECFCs were obtained from the culture of mononuclear cells (MNCs) in EGM2-MV® (Endothelial Growth Medium, Lonza, France) after a magnetic selection of CD34+ cells as previously described [18]. When an ECFC colony became microscopically visible, the cells were trypsinized and replated in six-well plates and in T75 flasks when confluent.

#### *Adult blood ECFC isolation*

Refused blood donations collected in CPDA bags (MacoPharma) were used for adult blood ECFC (AB-ECFC) culture. MNCs were obtained by gradient centrifugation on Histopaque®-1077 (Sigma-Aldrich) of whole blood diluted 1:1 with PBS (Eurobio) 1X-EDTA 2mM. After centrifugation at 400<sup>g</sup> for 20 minutes, MNCs were collected, washed three times in PBS-EDTA 2mM and cultured in EGM2-MV® in six-well plates coated with four different matrices: collagen, gelatin 0.2% (Sigma), laminin or fibronectin (ready to use coated six-well plates, Becton Dickinson), at 37°C with 5% CO<sub>2</sub> in a humidified incubator. Four seeding cell densities were tested with all matrices: 5x10<sup>6</sup>, 1x10<sup>7</sup>, 2.5x10<sup>7</sup> and 5x10<sup>7</sup> MNCs per well. The medium was changed on day 2, then daily for five days and twice a week until the first passage. ECFCs were counted by visual inspection with an inverted microscope at 5X magnification, once a week for one month.

### ECFC growth in the Clinicell system

To test the selected ECFC culture conditions in a standardized culture system, MNCs isolated from adult peripheral blood samples were cultured in parallel in six-well plates and in the Clinicell® system (Mabio, France). Both culture systems were coated with gelatin, and MNCs were seeded at the same density per cm<sup>2</sup> ( $2.6 \times 10^6$  cells/cm<sup>2</sup>) based on the seeding concentration of  $2.5 \times 10^7$  cells per well in six-well plates.

### In vitro ECFC proliferation assay

ECFC proliferative potential was evaluated by measuring cell alkaline phosphatase activity based on the release of paranitrophenol phosphate (pNPP) at 405nm (Fluostar Optima; BMG labtech, Champigny-sur-Marne, France) as reported elsewhere [19]. ECFC proliferation ( $1 \times 10^4$  cells per well) was measured after one night of total starvation in EBM2 medium alone followed by 48h of culture in 5% FBS-EBM2 medium.

### In vitro ECFC differentiation assay

After 16h of starvation in EBM2 medium, followed by 48h of culture in 5% FBS-EBM2 medium, ECFCs ( $3 \times 10^4$  cells/well) were seeded on growth factor-reduced Matrigel (200 pl) (BD Biosciences) and cultured for 18h at 37°C with 5% CO<sub>2</sub>. Capillary-like structures were identified using phase-contrast microscopy and networks formed by ECFCs were quantified with Videomet software version 5.4.0. (Microvision).

### In vivo ECFC angiogenic potential in a mouse model of hind-limb ischemia

Male six-week-old athymic mice (Nude-Foxn 1 from Harlan, France) underwent surgery to induce unilateral hindlimb ischemia as previously described [20]. They were randomized to receive an intravenous injection of  $1 \times 10^5$  ECFC or PBS. After two weeks, the ischemic versus normal limb blood flow ratio was determined with a laser Doppler perfusion imaging system (Moor Instruments).

All animal experiments were approved by local ethics committees (agreement number P2.CBV.030.07) and conducted in accordance with institutional guidelines.

## II. Vascular competence assessment in healthy volunteers

### *Study population*

Twenty-six male healthy volunteers were included based on the following criteria: absence of any known medical disease, no treatment by any drug known to impact EPC mobilization, normal physical examination and laboratory results within reference ranges. Two groups of thirteen volunteers aged 20- to 30- and 60- to 70-year-old, respectively, were recruited. This study was approved by the "Paris-Ile de France II" ethics committee and is registered in <http://clinicaltrials.gov> (NCT01038700).

### *Design of the study*

Pharmacological parameters and flow-mediated endothelial dilation (FMD) were measured 10 days after each volunteer's inclusion. Volunteers were subjected to a second procedure of forearm ischemia a week-apart dedicated to the quantification of circulating biological markers in whole blood, at rest and at different time points following ischemia. The total blood volume taken was equivalent to a blood donation. Blood samples (100 mL) were collected from the brachial vein draining the ischemic territory the day before the induction of ischemia (baseline or P1 sample). The same volume was collected immediately after deflating the cuff (P2), 2h later (P3), and 24h after (P4). At each time point, circulating markers of endothelial lesion or repair were quantified, namely microparticules, circulating endothelial cells and progenitor cells.

### *Pharmacological assessment of the endothelial function by the echotracking system*

#### *Arterial measurements*

An ultrasonic noninvasive investigation was performed on the subjects after 15 minutes of recumbent rest in a temperature-controlled (22°C) room dedicated to echography. Before the



ultrasound examination, brachial blood pressure (BP) measurements were taken using an oscillometric device at 3-minute intervals for 20 minutes, and the average was taken to be the casual BP level. Brachial pulse pressure (PP) was calculated as the difference between systolic BP and diastolic BP. The carotid external diameter at the end of the diastole (CD), the carotid pulsatility (delta of the carotid diameter at the systolic phase versus the diastolic phase) and the carotid intima-media thickness (tMT) were measured on the right common carotid artery (CCA) and 2 cm beneath the carotid bifurcation with a 7.5-MHz pulsed ultrasound echo-tracking system (Wall Track System; Esaote Pie-Medical) as already described [21]. This system has the advantage of high precision and allows repeated analysis of radiofrequency signals without a loss of quality. This technique has been validated and described in detail, and the repeatability of carotid measurements that range between <1% coefficient of variation for diameter, 4% for IMT and 10% for distensibility has been reported previously [22]. The CCA pressure waveform, and then the carotid pulse pressure and the augmentation index (AI), were determined with applanation tonometry (Sphygmocor) using a pencil-type probe that incorporated a high-fidelity Millar strain gauge transducer. To determine aortic stiffness, we measured aortic pulse wave velocity (PWV) along the descending thoraco-abdominal aorta using the foot-to-foot velocity method as implemented in the Complior device as described previously [21].

#### Non-invasive measurement of flow-mediated, endothelial-dependant vasodilation (FMD)

Endothelial function was evaluated by measuring the endothelium-dependent vasodilation in response to flow induced by release of a cuff after a 10/five minute-period of forearm ischemia obtained by inflating a sphygmomanometer to 50 mmHg over the systolic blood pressure versus the endothelium-independent response to sublingual glyceryl trinitrate (GTN) (Natispray 0.15 mg/dose; Procter&Gamble Pharmaceuticals) [23] was also measured. Subjects were instructed to lie down in a temperature-controlled room (21°C to 23°C) with their right arm secured comfortably on a support.

The diameter of the brachial artery (BD) was measured at baseline (after 30 minutes of rest in the supine position), during 10/5 minutes of forearm ischemia, during 60 and 120 seconds of reactive forearm hyperemia with a high-resolution radiofrequency-based vessel wall tracking system (Wall Track System; EsaotePie-Medical) using a 7.5-Mhz ultrasound probe, as already described [23]. The diameter of the brachial artery (BD) was measured again after 30 minutes rest and 3 minutes after the administration of 150 µg GTN. To reduce bias in the reading and interpretation of the hemodynamic results, all measurements were recorded on a hard drive using random codes and were analyzed independently by two readers who were blinded to the age and the temporal order of the measurements. The FMD response was expressed as the difference between the brachial diameter during hyperemia versus the brachial diameter under ischemia.

#### Biological assessment of vascular competence

##### *Quantification of microparticules*

Blood samples were drawn into 0.129 mol/l sodium citrate tubes (Vacutainer, Becton Dickinson) and processed according to the International Society of Thrombosis and Hemostasis (ISTH) recommendations for microparticles analysis [24]. Briefly, platelet-free plasma was obtained after an initial centrifugation at 1500 g for 15 min followed by a 2 min centrifugation at 13 000 g and was then frozen until required for analysis. MP subpopulations were analyzed using selective fluorochrome-labelled antibodies from Immunotech, Beckman Coulter (Marseille, France): anti-CD31 (PECAM-1, clone 1F11, Beckman Coulter, Marseille, France) and anti-CD41 (GpIIbIIIa) (phycoerythrin-CD41clone P2) for EMP defined by CD31+CD41-, anti-CD41 for platelet MP (PMP) and anti-glycophorinA for erythrocyte MP (ErMP: phycoerythrin-CD235a) and with Annexin-V binding for phosphatidylserine-expressing MPs, whatever their cellular origin (TMPs). After thawing, 30 ml of plasma were incubated with specific monoclonal antibodies or with FITC-AnnexinV or with corresponding isotype-controls (FITC-IgG1 and PE-IgG1). After a 30-min incubation at room temperature, samples were diluted in 1.5 ml of PBS (Dul-belcco's; Life

Technologies, Paisley, U.K) or binding buffer for Annexin-V labelling (Beckman Coulter Immunotech). MPs were enumerated by flow cytometry (CXP FC500 Beckmann Coulter), according to their size and fluorescence in a LogFS LogSS dotplot. The flowcount beads were counted in a LogFS-LogFL3 dotplot and used as internal standard to express MP count as number of MP/ml of plasma.

#### *Quantification of Circulating Endothelial Cells*

Circulating Endothelial Cells (CECs) were quantified using magnetic immunoseparation from 1 mL of whole blood collected on EDTA as described elsewhere [25]. The number of CECs was expressed as cells per millilitre of blood.

#### *Quantification of Circulating Progenitor Cells*

MNCs were isolated from 8 mL of heparinized whole blood by gradient centrifugation as described before (see Adult blood ECFC isolation). Hematopoietic and endothelial progenitor cells both express CD34 and CD133. Circulating progenitor cells (CPCs) defined as CD34+CD133+7AAD- cells were then quantified by flow cytometry after a staining by an anti-CD34-FITC antibody (Beckman Coulter, France), an anti-CD133-PE antibody (Miltenyi Biotec, France) and a viability dye, the 7-aminoactinomycin D (7-AAD), with a minimum of 500 000 viable cells acquired. Results were expressed as absolute numbers of CPCs.mL<sup>-1</sup> of blood.

#### *Quantification of Circulating Hematopoietic Progenitor Cells*

The hematopoietic progenitor cells (HPCs), defined as CD34+CD45dim7AAD- cells, were counted by flow cytometry (FC500 Cytometer; Beckman Coulter, Villepinte, France) using the Stemkit® technique (Beckman Coulter). Fifty microliters of EDTA-anticoagulated whole blood were stained with an anti-CD45-fluorescein isothiocyanate (FITC) monoclonal murine antibody, an anti-CD34-phycoerythrin (PE) monoclonal murine antibody, and 7-AAD. Absolute numbers of HPCs.mL<sup>-1</sup> were determined using the Stemcount® beads, as recommended by the manufacturer.

### *Quantification of Circulating Endothelial Progenitor Cells*

Circulating EPCs defined as CD34<sup>+</sup>KDR<sup>+</sup>7AAD<sup>-</sup> cells were counted by MNC staining with the same anti-CD34-FITC antibody used for CPC quantification, an anti-KDR-PE monoclonal antibody (R&D Systems, France) and 7AAD, with a minimum of 500 000 viable cells acquired. Results were expressed as absolute numbers of EPCs.mL<sup>-1</sup> were calculated using the absolute count of CD34<sup>+</sup> cells previously determined with the Stemkit®.

### *Quantification of Endothelial Colony-Forming Cells*

Endothelial colony-forming cells (ECFCs) were obtained from MNCs, isolated as described above from 64 mL of heparinized peripheral blood, and seeded on fibronectin at  $2.5 \times 10^7$  cells per well in EGM2-MV®. ECFC colonies were counted by visual inspection with an inverted microscope at 5X magnification once a week for one month.

### *Angiogenic properties of ECFCs*

To study the impact of ischemia on ECFC angiogenic properties, viability assays and in vivo angiogenic potential were assessed on ECFCs isolated at different timepoints of the procedure. For methodological details, see above (optimization of ECFC culture).

## III. Statistical analysis

The results of ECFC culture optimization and functional studies were analyzed using paired t-test and, repeated measures or not, one-way ANOVA statistical tests with Graph Pad Prism® software (San Diego, CA, USA).

Effects of age and local ischemia on circulating markers of endothelial lesion or repair and pharmacological parameters were assessed using linear mixed models. Each model included the group (20-30 years old versus 60-70 years old), the period (before ischemia, just after ischemia, two hours later and 24 hours later) and the interaction between group and period as fixed effects and a modelling covariance structure within subjects. Degrees of freedom were estimated by the between-

within method and the best covariance structure was chosen between compound symmetric, first order autoregressive and spatial power structure. When a global effect was significant, pairwise comparisons between different age groups and/or periods were tested using the Holm step down procedure for multiple tests. For parameters non-normally distributed, a log-transformation was applied.

Data are expressed as medians and their interquartile range or as means and their standard deviations. Mean changes from baseline (before ischemia) or between age groups were presented as mean percentages calculated on the basis of the ratio of geometric means with 95 % confidence intervals (CI) or as means with 95 % confidence intervals (CI).

Correlations between circulating markers of endothelial lesion or repair and pharmacological parameters were assessed with Pearson and Spearman correlation coefficient according to parameters distribution. SAS Statistical Software 8.2 (Cary, NC 27513, USA) was used for statistical analysis. A p value of less than 0.05 was considered to be significant.

## Results

In vitro commitment of MNCs to AB-ECFCs is influenced by the seeding density but not by the matrix type.

MNCs from recused adult blood donations were plated on gelatin, laminin, collagen or fibronectin at four seeding densities:  $5 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^7$ ,  $2.5 \times 10^7$  and  $5 \times 10^7$  cells per well. ECFC colonies were defined as cobblestone-shaped adherent cells that stained positive for VWF, KDR, CD144, CD146 and CD31 (data not shown). They appeared after a median of 23 days of culture in all culture conditions tested. No significant differences in ECFC commitment were observed with the four matrices whatever the MNC seeding concentration (Figure 1-A). Therefore, the impact of the seeding concentration was evaluated independently of the matrix type. The ECFC colony number recovered per  $10^6$  MNCs was significantly higher at the seeding concentrations of  $5 \times 10^6$  and  $2.5 \times 10^7$  cells per well with  $p < 0.01$  (mean ECFC of 0.01 per  $10^6$  MNCs at  $5 \times 10^6$  cells per well, 0.007 at  $1 \times 10^7$ , 0.01 at  $2.5 \times 10^7$ , and 0.004 at  $5 \times 10^7$ ) (Figure 1-B). The Clinicell® device is a CE-labeled compact sterile cell culture cassette that is robust and fully closed. No differences were observed between the use of six-well plates and Clinicell® cassette either for AB-ECFC commitment (Figure 1-C) for colony morphology or endothelial phenotype (data not shown).

ECFC angiogenic properties during expansion are decreased on laminin coating in vitro and in vivo. To analyze *in vitro* angiogenic properties of AB-ECFCs, CB-ECFCs were used as controls. For all experiments, results were expressed relative to gelatin. Both AB-ECFCs and CB-ECFCs had a significantly lower proliferation potential with  $p < 0.0001$ , when expanded on laminin (Figure 1-D) and formed significantly more tubes,  $p < 0.0001$  (Figure 1-E). The impact of the matrices on *in vivo* angiogenesis was tested with CB-ECFCs. In the nude murin model of hindlimb ischemia, mice were

randomly assigned to receive intravenously PBS or  $10^5$  CB-ECFCs cultured for 48 hours on gelatin, laminin or fibronectin. ECFCs cultured on laminin lost their capacity to rescue ischemic hindlimb flow, whereas that cultured on gelatin or fibronectin induced an expected flow recovery compared to PBS with  $p < 0.05$  (Figure 1-F).

The optimized method we proposed is presented in Figure 2. As large amount of whole blood are needed to obtain enough ECFCs, we selected the higher seeding concentration giving the best commitment that was  $2.5 \times 10^7$  MNCs per well. Then, despite an absence of impact on ECFC commitment, laminin was excluded to culture ECFCs as it promotes *in vitro* differentiation of these cells, decreases their proliferation potential and abolished their *in vivo* angiogenic properties in the murine model tested. As no differences were observed between the three other matrices, we selected the use of fibronectin for ECFC culture as this matrix is most commonly used classically in vascular cell culture.

Aging enhances arterial stiffness without altering endothelial reactivity or circulating endothelial compartment

Thirteen volunteers were included in two age group of 20-30 and 60-70 years old. Their clinical characteristics are presented in Table 1. The younger volunteers were significantly taller and had lower waist circumferences. Systolic and diastolic blood pressures were significantly higher in the elderly, but no subjects suffered from hypertension, with a preserved pulse pressure (Table 2). Elderly subjects had more dilated and thicker carotids as well as a lower pulsatility (delta of carotid diameter between systole and diastole) reflecting increase arterial stiffness with aging (Table 2). This physiological arterial stiffness was also testified by the increase of the augmentation index (AI%) and of the pulse wave velocity (PWV) (Table 2). As aging did not impact the absolute amplitude of FMD (Table 2), the evaluation of endothelial reactivity was made in the overall populations, showing a significant effect of the hyperemia procedure with  $p = 0.0002$  (Figure 3-A),

reflecting preservation of the endothelium-dependant vasodilation mechanism despite aging in this study. GTN-induced dilation was significant in both groups with  $p < 0.0001$  (Figure 3-A), which is in favour of preserved smooth muscle cell functionality. Interestingly, endothelium-independent dilation was significantly more important in the older population (Table 2).

For all circulating vascular biomarkers studied, a group effect, a period effect and the interaction between both parameters (reflect of an impact of aging on vascular adaptation under ischemia), were investigated over the four periods (before ischemia, just after ischemia, two hours later and 24 hours later). Results are summarized in Table 3. Among the biomarkers of activation, PMPs (CD41+) were significantly higher in the 20- to 30-year-old group, whatever the period (Table 3). However, aging did not impact endothelial lesion biomarkers measured (EMPs and CECs) (Table 3). Levels of HPCs (CD34+CD45dim) were significantly higher in the 20- to 30-year-old group but no modification of other progenitor subtypes quantified by flow cytometry or culture was observed with aging, either CPCs (CD34+CD133+) or endothelial progenitor cells (CD34+KDR+ and ECFCs) (Table 3).

Independently of the age, baseline total MP level inversely correlated with the pulse wave velocity with  $p = 0.04$  and  $r = -0.442$ . The lower total MP level was, the more important arterial stiffness was. The FMD response was inversely correlated with EMP level at rest, with  $p = 0.005$  and  $r = -0.549$  suggesting a predictive value of endothelial reactivity by the EMP level. No effect of aging was observed on vascular response to ischemia, as no interactions between groups and periods were observed.

#### Forearm ischemia decreases ECFC angiogenic properties

Ischemia induced platelet activation in both groups with a significant increase of PMPs, PMPs CD41+ and PMPs CD41+AnnexinV+, after ischemia until 24 hours later (Table 3 and Figure 3-B). In addition PMP-AnV release two hours after ischemia was associated to the FMD with  $p = 0.0202$



and  $r=0.462$  (Figure 3-C). A positive correlation was observed between PWV and the delta of EMPs released just after ischemia ( $p=0.02$ ,  $r=0.449$ ) and two hours later ( $p=0.03$ ,  $r=0.429$ ). In circulating endothelial compartment, a significant increase of subjects with presence of CECs was also observed in both groups just after ischemia, without reaching pathological level (Table 3). For markers of regeneration, HPC and CPC levels were not modified after forearm ischemia. We found the same result with circulating EPCs and ECFCs. The delta of ECFCs just after ischemia versus baseline was inversely correlated with PWV ( $p=0.0454$ ,  $r=-0.45$ ).

However, while level of ECFCs did not differ upon forearm ischemia, their angiogenic potential was altered two hours after ischemia. Indeed, a significant decreased of the *in vitro* proliferation potential in both groups ( $p=0.048$ ) (Figure 4-A) together with a decreased tube formation ability were observed (Figure 4-B). The baseline properties were rescued 24 hours after ischemia. The *in vivo* angiogenic properties of ECFCs were finally tested in hind limb ischemia model in Nude mice and were also significantly altered after forearm ischemia ( $p=0.0193$  for ECFCs isolated after forearm ischemia) (Figure 4-C).

## Discussion

The present study focused on the ability of a forearm ischemia to mobilize ECFC, currently recognized as true endothelial progenitor cells, and to test the effect of aging on circulating endothelial compartment. Optimized adult ECFC culture conditions were firstly determined and applied to a clinical-grade culture system. Then, vascular biomarkers of two age groups of healthy volunteers was clinically and biologically assessed. Results showed that despite an increase of arterial stiffness with aging, endothelial reactivity was preserved. Aging did not impact the vascular competence either at baseline or in a dynamic situation of endothelial stimulation by a local ischemia procedure. This procedure led to a release of PMP and decreased ECFC angiogenic properties, without any change of the circulating endothelial compartment levels, whatever the age group. To our knowledge, this is the first study to compare several aspects of vascular competence according to age in a dynamic situation of endothelial activation.

### ECFC culture optimization

The potential use of ECFC as a cell therapy product implies a culture step as a method to isolate and expand them. The need of a consensual culture process is however usually expressed as shown by the diversity of matrix types used for plate coating: collagen [8, 26-28], gelatin [18, 29, 30], laminin or fibronectin [31, 32] and the MNC seeding densities [8, 11, 29, 33]. Moreover, the regulation of angiogenesis by the extracellular membrane justified the comparison between matrices used for EPC isolation [34]. To optimize ECFC culture, we evaluated the impact of both parameters on ECFC commitment. No conditions impacted the delay of ECFC growth, that was similar to what Yoder et al reported [8]. Using MNC seeding densities of  $5 \times 10^6$  and  $2.5 \times 10^7$  cells per well, the ECFC yield was close to that reported by Yoder, i.e. 0.017 ECFC colonies per  $10^6$  MNCs, whatever the matrix type [8]. Neither matrix type nor the seeding densities tested improved that. Moreover, AB-ECFCs showed a

lower proliferation potency compared to CB-ECFCs as already described [9, 11]. Our results suggest not to use laminin as the matrix, as a decrease of *in vivo* CB-ECFCs angiogenic properties was observed in the murine model of ischemic foot reperfusion when cultured on laminin. *In vitro*, the modification of ECFC angiogenic properties after culture on laminin towards a differentiated stage is in line with the reported effect of this endothelial extracellular matrix component of enhancing endothelial cell differentiation and stabilization [34]. ECFC culture thus optimized was applied for the biological assessment of vascular competence of healthy volunteers.

#### Impact of aging on endothelial function and on circulating endothelial compartment

Aging is known to induce endothelial dysfunction [35] by different mechanisms including vascular repair defect [36]. Indeed, transplantation of bone-marrow derived EPCs from young, but not old donor mice, prevented the decline in the angiogenic platelet-derived growth factor (PDGF)-B signaling and cardiac angiogenesis in an aging murine model [37]. Endothelial dysfunction with aging induces arterial wall stiffening [38] and endothelial reactivity impairment [12, 39-41]. In our study, the selection of the healthy elderly volunteers was validated by the increase of intima-media thickness, the pulse wave velocity and the augmentation index which all reflect arterial stiffening [42]. The hyperemic shear stress stimulus increased brachial artery diameter in both the older and the younger subjects, demonstrating that the physiological stimulus was sufficient to induce FMD in both groups. The comparison between our and other studies must take into account the methods used, as it can involve NO-independant mechanism [43], and the way FMD is calculated. For example, a study demonstrated endothelial function preservation when FMD was normalized with shear stress [44]. The endothelial reactivity preservation observed in our study could also be explained by the different susceptibility to atherosclerosis of the vascular sites studied [45], explaining that result, despite arterial stiffening. EPC level and function have been reported decreased with aging. However, EPC definition

used in these studies was heterogeneous, including either CD34+ cells [47] or CFU-EC [48]. To clarify, a decrease in HPC during aging, such as observed in the present study, is well described [47, 49] and explained by a defect of mobilization instead of bone marrow depletion [50]. Other groups have quantified CD34+CD133+ cells, named circulating progenitor cells in our study, and, contrary to our results found a decreased level during aging [48, 51]. Other discordances exist in the CD34+KDR+ cell and CFU-EC counts, with either an aging-associated decrease [49, 52, 53] or no change [48, 54]. Whatever the CFU-EC level, their functionality was always found impaired [52, 54]. The present work is the first one to study ECFC count along aging. The absence of EPC decrease in the elder group could be explained by a still well preserved endothelial integrity in a group of healthy subjects with no cardiovascular risks, as confirmed by the preservation of endothelial reactivity. Finally, the timely evolution of the circulating biological parameters under ischemia was not either affected by aging as no interaction between groups and periods was observed.

#### Forearm ischemia cannot enhance ECFC mobilization

The rationale to use a strong forearm ischemia was based on two observations. First one was the description of resident EPC in the vascular wall [17]. Second was the observation that an acute organ ischemia, such as myocardial infarction, provides a strong chemokine signal, mobilizing progenitors from the bone marrow into the circulation [55], whereas chronic vascular injury is associated with reduced circulating EPC numbers [56, 57]. We hypothesized that EPC mobilized from the vessel would appear in the peripheral blood immediately or 2 hours after ischemia. An EPC increase 24 hours later would be more in favor of a medullar origin of these cells. No significant ECFC increase was observed, whatever the subsets studied and whatever the period after ischemia, suggesting an absence of EPC recruitment either from the vascular wall or from the bone marrow, at least in the conditions studied here. Tissue ischemia [3] and exercise [58] induced bone marrow EPC mobilization and

angiogenic properties in animal models. A fast but transient human EPC mobilization was also observed after coronary artery bypass surgery [51], burns [30] and myocardial infarction [55]. Moreover, Zengin et al described a vasculogenic zone in the vessel wall containing these resident progenitor cells and localized between the smooth muscle cells and the adventitia [59]. Another explanation is that resident cells are not exposed to shear stress and therefore are not released in blood, but just act for the local vascular repair. Moreover, an heterogeneity in the amount of EPC has been described according to vessel types in rat pulmonary vessels with predominance in the microvasculature [60]. Side population stem cells have also been identified mainly in vein and capillaries of several organs in mice [61]. Thus, EPC mobilization from vessel wall should also take into account the type of vessel stimulated. In their forearm ischemia model, Friedrich et al reported the mobilization of a more immature population, that are CD34-CD133+ cells and a decrease of CD34+CD133+ cells after ischemia [16]. However, we did not use the same ischemic conditions, with a shorter but more potent ischemic procedure. Despite the preservation of vascular competence in elderly healthy volunteers, our results suggest that a local ischemia procedure cannot be used as a tool to collect more EPCs. The mechanisms by which it alters ECFC angiogenic properties need to be further explored. One of the hypotheses should be that PMP released secrete anti-angiogenic molecules from their granules. This hypothesis on EPC and platelet component interaction seems promising since Italianos group described a release modulation of angiogenesis regulatory proteins from platelet alpha granules in physiologic and pathologic angiogenesis [62].

In conclusion, we propose ECFC culture conditions that could be adopted as a consensus method and enable multicenter studies for ECFC quantification and characterization in different clinical settings, with a view to develop a cell therapy product. To this purpose, the procedure of local ischemia such as tested in this study did not allow us to mobilize EPCs from vascular wall or bone

marrow and even revealed to decrease their angiogenic potential. Mechanisms should be further explored and could explain the failure of EPC mobilization in ischemic disorders independently of endothelial alteration.

## Acknowledgments

Nursing service of CIC. We are also indebted to the nursing services of Hopital des Instructions et des Armees de Begin (Saint Mande, France) for providing umbilical cord blood. We thank I. Galy-Fauroux and A. Lokajczyk for their technical assistance in cord blood-ECFC culture. We thank J.Corneille for his technical assistance in adult blood-ECFC culture optimization. We thank Chantal Martin and all the technicians of the IMTCE animal facility.

**Sources of funding:** Laetitia Mauge was supported by a research grant from the AP-HP. Clement d'Audigier was supported by a research grant from Fondation pour la Recherche Medicale. We received research grants from Fondation pour la Recherche Medicale ( Grant application 2006: "Vieillissement cardiovasculaire normal et pathologique").

Disclosures: **None.**

## References

1. Asahara, T., T. Murohara, A. Sullivan, M. Silver, R. van der Zee, T. Li, B. Witzenbichler, G. Schatteman, and J.M. Isner (1997) Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 275: p. 964-7.
2. Asahara, T., H. Masuda, T. Takahashi, C. Kalka, C. Pastore, M. Silver, M. Kearne, M. Magner, and J.M. Isner (1999) Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. *Circ Res* 85: p. 221-8.
3. Takahashi, T., C. Kalka, H. Masuda, D. Chen, M. Silver, M. Kearney, M. Magner, J.M. Isner, and T. Asahara (1999) Ischemia- and cytokine-induced mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for neovascularization. *Nat Med* 5: p. 434-8.
4. Werner, N., S. Kosiol, T. Schiegl, P. Ahlers, K. Walenta, A. Link, M. Bohm, and G. Nickenig (2005) Circulating endothelial progenitor cells and cardiovascular outcomes. *N Engl J Med* 353: p. 999-1007.
5. Vasa, M., S. Fichtlscherer, A. Aicher, K. Adler, C. Urbich, H. Martin, A.M. Zeiher, and S. Dimmeler (2001) Number and migratory activity of circulating endothelial progenitor cells inversely correlate with risk factors for coronary artery disease. *Circ Res* 89: p. E1-7.
6. Timmermans, F., J. Plum, M.C. Yoder, D.A. Ingram, B. Vandekerckhove, and J. Case (2009) Endothelial progenitor cells: identity defined? *J Cell Mol Med* 13: p. 87-102.
7. Duda, D.G., K.S. Cohen, D.T. Scadden, and R.K. Jain (2007) A protocol for phenotypic detection and enumeration of circulating endothelial cells and circulating progenitor cells in human blood. *Nat Protoc* 2: p. 805-10.
8. Yoder, M.C., L.E. Mead, D. Prater, T.R. Krier, K.N. Mroueh, F. Li, R. Krasich, C.J. Temm, J.T. Prchal, and D.A. Ingram (2007) Redefining endothelial progenitor cells via clonal analysis and hematopoietic stem/progenitor cell principals. *Blood* 109: p. 1801-9.
9. Ingram, D.A., L.E. Mead, H. Tanaka, V. Meade, A. Fenoglio, K. Mortell, K. Pollok, M.J. Ferkowicz, D. Gilley, and M.C. Yoder (2004) Identification of a novel hierarchy of endothelial progenitor cells using human peripheral and umbilical cord blood. *Blood* 104: p. 2752-60.
10. Smadja, D.M., I. Bieche, J.S. Silvestre, S. Germain, A. Cornet, I. Laurendeau, J.P. Duong-Van-Huyen, J. Emmerich, M. Vidaud, M. Aiach, and P. Gaussem (2008) Bone morphogenetic proteins 2 and 4 are selectively expressed by late outgrowth endothelial progenitor cells and promote neoangiogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 28: p. 2137-43.
11. Smadja, D.M., L. Mauge, S. Susen, I. Bieche, and P. Gaussem (2009) Blood outgrowth endothelial cells from cord blood and peripheral blood: angiogenesis-related characteristics in vitro: a rebuttal. *J Thromb Haemost* 7: p. 504-6; author reply 506-8.
12. Gates, P.E., M.L. Boucher, A.E. Silver, K.D. Monahan, and D.R. Seals (2007) Impaired flow-mediated dilation with age is not explained by L-arginine bioavailability or endothelial asymmetric dimethylarginine protein expression. *J Appl Physiol* 102: p. 63-71.
13. Hattori, K., S. Dias, B. Heissig, N.R. Hackett, D. Lyden, M. Tateno, D.J. Hicklin, Z. Zhu, L. Witte, R.G. Crystal, M.A. Moore, and S. Rafii (2001) Vascular endothelial growth factor and angiopoietin-1 stimulate postnatal hematopoiesis by recruitment of vasculogenic and hematopoietic stem cells. *J Exp Med* 193: p. 1005-14.
14. Ott, I., U. Keller, M. Knoedler, K.S. Gotze, K. Doss, P. Fischer, K. Urbauer, G. Debus, N. von Bubnoff, M. Rudelius, A. Schomig, C. Peschel, and R.A. Oostendorp (2005) Endothelial-like cells expanded from CD34+ blood cells improve left ventricular function after experimental myocardial infarction. *Faseb J* 19: p. 992-4.



15. Iwaguro, H., J. Yamaguchi, C. Kalka, S. Murasawa, H. Masuda, S. Hayashi, M. Silver, T. Li, J.M. Isner, and T. Asahara (2002) Endothelial progenitor cell vascular endothelial growth factor gene transfer for vascular regeneration. *Circulation* 105: p. 732-8.
16. Friedrich, E.B., K. Walenta, J. Scharlau, G. Nickenig, and N. Werner (2006) CD34-/CD133+/VEGFR-2+ endothelial progenitor cell subpopulation with potent vasoregenerative capacities. *Circ Res* 98: p. e20-5.
17. Ingram, D.A., L.E. Mead, D.B. Moore, W. Woodard, A. Fenoglio, and M.C. Yoder (2005) Vessel wall-derived endothelial cells rapidly proliferate because they contain a complete hierarchy of endothelial progenitor cells. *Blood* 105: p. 2783-6.
18. Bompais, H., J. Chagraoui, X. Canon, M. Crisan, X.H. Liu, A. Anjo, C. Tolla-Le Port, M. Leboeuf, P. Charbord, A. Bikfalvi, and G. Uzan (2004) Human endothelial cells derived from circulating progenitors display specific functional properties compared with mature vessel wall endothelial cells. *Blood* 103: p. 2577-84.
19. Evrard, S.M., D.A. C, L. Mauge, D. Israel-Biet, C.L. Guerin, I. Bieche, J.C. Kovacic, A.M. Fischer, P. Gaussem, and D.M. Smadja (2012) The profibrotic cytokine transforming growth factor-beta1 increases endothelial progenitor cell angiogenic properties. *J Thromb Haemost* 10: p. 670-9.
20. Silvestre, J.S., Z. Mallat, M. Duriez, R. Tamarat, M.F. Bureau, D. Scherman, N. Duverger, D. Branellec, A. Tedgui, and B.I. Levy (2000) Antiangiogenic effect of interleukin-10 in ischemia-induced angiogenesis in mice hindlimb. *Circ Res* 87: p. 448-52.
21. Gompel, A., P. Boutouyrie, R. Joannides, S. Christin-Maitre, A. Kearny-Schwartz, K. Kunz, S. Laurent, J.M. Boivin, B. Pannier, B. Pornel, H.A. Struijker-Boudier, C. Thuillez, L. Van Bortel, F. Zannad, I. Pithois-Merli, P. Jaillon, and T. Simon (2011) Association of menopause and hormone replacement therapy with large artery remodeling. *Fertil Steril* 96: p. 1445-50.
22. Boutouyrie, P., C. Bussy, D. Hayoz, J. Hengstler, N. Dartois, B. Laloux, H. Brunner, and S. Laurent (2000) Local pulse pressure and regression of arterial wall hypertrophy during long-term antihypertensive treatment. *Circulation* 101: p. 2601-6.
23. Azizi, M., P. Boutouyrie, A. Bissery, M. Agharazii, F. Verbeke, N. Stern, A. Bura-Riviere, S. Laurent, F. Alhenc-Gelas, and X. Jeunemaitre (2005) Arterial and renal consequences of partial genetic deficiency in tissue kallikrein activity in humans. *J Clin Invest* 115: p. 780-7.
24. Jy, W., L.L. Horstman, J.J. Jimenez, Y.S. Ahn, E. Biro, R. Nieuwland, A. Sturk, F. Dignat-George, F. Sabatier, L. Camoin-Jau, J. Sampol, B. Hugel, F. Zobairi, J.M. Freyssinet, S. Nomura, A.S. Shet, N.S. Key, and R.P. Hebbel (2004) Measuring circulating cell-derived microparticles. *J Thromb Haemost* 2: p. 1842-51.
25. Smadja, D.M., P. Gaussem, L. Mauge, D. Israel-Biet, F. Dignat-George, S. Peyrard, G. Agnoletti, P.R. Vouhe, D. Bonnet, and M. Levy (2009) Circulating endothelial cells: a new candidate biomarker of irreversible pulmonary hypertension secondary to congenital heart disease. *Circulation* 119: p. 374-81.
26. Au, P., L.M. Daheron, D.G. Duda, K.S. Cohen, J.A. Tyrrell, R.M. Lanning, D. Fukumura, D.T. Scadden, and R.K. Jain (2008) Differential in vivo potential of endothelial progenitor cells from human umbilical cord blood and adult peripheral blood to form functional long-lasting vessels. *Blood* 111: p. 1302-5.
27. Lin, Y., D.J. Weisdorf, A. Solovey, and R.P. Hebbel (2000) Origins of circulating endothelial cells and endothelial outgrowth from blood. *J Clin Invest* 105: p. 71-7.
28. Case, J., L.E. Mead, W.K. Bessler, D. Prater, H.A. White, M.R. Saadatzaheh, J.R. Bhavsar, M.C. Yoder, L.S. Haneline, and D.A. Ingram (2007) Human CD34+AC133+VEGFR-2+ cells are not endothelial progenitor cells but distinct, primitive hematopoietic progenitors.

- Exp Hematol 35: p. 1109-18.
29. Hur, J., C.H. Yoon, H.S. Kim, J.H. Choi, H.J. Kang, K.K. Hwang, B.H. Oh, M M. Lee, and Y.B. Park (2004)Characterization of two types of endothelial progenitor cells and their different contributions to neovasclogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24: p. 288-93.
  30. Gill, M., S. Dias, K. Hattori, M.L. Rivera, D. Hicklin, L. Witte, L. Girardi, R. Yurt, H. Himel, and S. Rafii (2001)Vascular trauma induces rapid but transient mobilization of VEGFR2(+)AC133(+) endothelial precursor cells. *Circ Res* 88: p. 167-74.
  31. Reyes, M., A. Dudek, B. Jahagirdar, L. Koodie, P.H. Marker, and C.M. Verfaillie (2002). Origin of endothelial progenitors in human postnatal bone marrow. *J Clin Invest* 109: p. 337-46.
  32. Braunstein, M., T. Ozcelik, S. Bagislar, V. Vakil, E.L. Smith, K. Dai, C.B. Akyerli, and O.A. Batuman (2006)Endothelial progenitor cells display clonal restriction in multiple myeloma. *BMC Cancer* 6: p. 161.
  33. Avouac, J., F. Juin, J. Wipff, P.O. Couraud, G. Chiochia, A. Kahan, C. Boileau, G. Uzan, and Y. Allanore (2008)Circulating endothelial progenitor cells in systemic sclerosis: association with disease severity. *Ann Rheum Dis* 67: p. 1455-60.
  34. Davis, G.E. and D.R. Senger (2005)Endothelial extracellular matrix: biosynthesis, remodeling, and functions during vascular morphogenesis and neovessel stabilization. *Circ Res* 97: p. 1093-107.
  35. Taddei, S., A. Virdis, P. Mattei, L. Ghiadoni, A. Gennari, C.B. Fasolo, I. Sudano, and A. Salvetti (1995)Aging and endothelial function in normotensive subjects and patients with essential hypertension. *Circulation* 91: p. 1981-7.
  36. Toda, N. (2012)Age-related changes in endothelial function and blood flow regulation. *Pharmacol Ther* 133: p. 159-76.
  37. Edelberg, J.M., L. Tang, K. Hattori, D. Lyden, and S. Rafii (2002)Young adult bone marrow-derived endothelial precursor cells restore aging-impaired cardiac angiogenic function. *Circ Res* 90: p. E89-93.
  38. Ziemann, S.J., V. Melenovsky, and D.A. Kass (2005)Mechanisms, pathophysiology, and therapy of arterial stiffness. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25: p. 932-43.
  39. Chauhan, A., R.S. More, P.A. Mullins, G. Taylor, C. Petch, and P.M. Schofield (1996) Aging-associated endothelial dysfunction in humans is reversed by L-arginine. *J Am Coll Cardiol* 28: p. 1796-804.
  40. Gerhard, M., M.A. Roddy, S.J. Creager, and M.A. Creager (1996)Aging progressively impairs endothelium-dependent vasodilation in forearm resistance vessels of humans. *Hypertension* 27: p. 849-53.
  41. Celermajer, D.S., K.E. Sorensen, D.J. Spiegelhalter, D. Georgakopoulos, J. Robinson, and J.E. Deanfield (1994)Aging is associated with endothelial dysfunction in healthy men years before the age-related decline in women. *J Am Coll Cardiol* 24: p. 471-6.
  42. O'Rourke, M.F., J.A. Staessen, C. Vlachopoulos, D. Duprez, and G.E. Plante (2002)Clinical applications of arterial stiffness; definitions and reference values. *Am J Hypertens* 15: p.
  43. Mullen, M.J., R.K. Kharbanda, J. Cross, A.E. Donald, M. Taylor, P. Vallance, J.E. Deanfield, and R.J. MacAllister (2001)Heterogenous nature of flow-mediated dilatation in human conduit arteries in vivo: relevance to endothelial dysfunction in hypercholesterolemia. *Circ Res* 88: p. 145-51.
  44. Wray, D.W., A. Uberoi, L. Lawrenson, and R.S. Richardson (2006)Evidence of preserved endothelial function and vascular plasticity with age. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 290: p. H1271-7.
  45. Barton, M., F. Cosentino, R.P. Brandes, P. Moreau, S. Shaw, and T.F. Luscher (1996) Anatomic heterogeneity of vascular aging: role of nitric oxide and endothelin. *Hypertension* 30: p. 817-24.

46. Siljander, P.R. (2011)Platelet-derived microparticles - an updated perspective. *Thromb Res* 127 Suppl 2: p. S30-3.
47. Tao, J., Y. Wang, Z. Yang, C. Tu, M.G. Xu, and J.M. Wang (2006)Circulating endothelial progenitor cell deficiency contributes to impaired arterial elasticity in persons of advancing age. *J Hum Hypertens* 20: p. 490-5.
48. Shaffer, R.G., S. Greene, A. Arshi, G. Supple, A. Bantly, J.S. Moore, and E.R. Mohler, 3rd (2006)Flow cytometric measurement of circulating endothelial cells: the effect of age and peripheral arterial disease on baseline levels of mature and progenitor populations. *Cytometry B Clin Cytom* 70: p. 56-62.
49. Thijssen, D.H., J.B. Vos, C. Verseyden, A.J. van Zonneveld, P. Smits, F.C. Sweep, M.T. Hopman, and H.C. de Boer (2006)Haematopoietic stem cells and endothelial progenitor cells in healthy men: effect of aging and training. *Aging Cell* 5: p. 495-503.
50. Povsic, T.J., J. Zhou, S.D. Adams, M.P. Bolognesi, D.E. Attarian, and E.D. Peterson (2010)Aging is not associated with bone marrow-resident progenitor cell depletion. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 65: p. 1042-50.
51. Scheubel, R.J., H. Zorn, R.E. Silber, O. Kuss, H. Morawietz, J. Holtz, and A. Simm (2003)Age-dependent depression in circulating endothelial progenitor cells in patients undergoing coronary artery bypass grafting. *J Am Coll Cardiol* 42: p. 2073-80.
52. Hoetzer, G.L., G.P. Van Guilder, H.M. Irmiger, R.S. Keith, B.L. Stauffer, and C.A. DeSouza (2007)Aging, exercise, and endothelial progenitor cell clonogenic and migratory capacity in men. *J Appl Physiol* 102: p. 847-52.
53. Vasa, M., S. Fichtlscherer, K. Adler, A. Aicher, H. Martin, A.M. Zeiher, and S. Dimmeler (2001)Increase in circulating endothelial progenitor cells by statin therapy in patients with stable coronary artery disease. *Circulation* 103: p. 2885-90.
54. Heiss, C., S. Keymel, U. Niesler, J. Ziemann, M. Kelm, and C. Kalka (2005)Impaired progenitor cell activity in age-related endothelial dysfunction. *J Am Coll Cardiol* 45: p. 1441-8.
55. Shintani, S., T. Murohara, H. Ikeda, T. Ueno, T. Honma, A. Katoh, K. Sasaki, T. Shimada, Y. Oike, and T. Imaizumi (2001)Mobilization of endothelial progenitor cells in patients with acute myocardial infarction. *Circulation* 103: p. 2776-9.
56. Loomans, C.J., E.J. de Koning, F.J. Staal, M.B. Rookmaaker, C. Verseyden, H.C. de Boer, M.C. Verhaar, B. Braam, T.J. Rabelink, and A.J. van Zonneveld (2004)Endothelial progenitor cell dysfunction: a novel concept in the pathogenesis of vascular complications of type 1 diabetes. *Diabetes* 53: p. 195-9.
57. Tepper, O.M., R.D. Galiano, J.M. Capla, C. Kalka, P.J. Gagne, G.R. Jacobowitz, J.P. Levine, and G.C. Gurtner (2002)Human endothelial progenitor cells from type II diabetics exhibit impaired proliferation, adhesion, and incorporation into vascular structures. *Circulation* 106: p. 2781-6.
58. Laufs, U., N. Werner, A. Link, M. Endres, S. Wassmann, K. Jurgens, E. Mische, M. Bohm, and G. Nickenig (2004)Physical training increases endothelial progenitor cells, inhibits neointima formation, and enhances angiogenesis. *Circulation* 109: p. 220-6.
59. Zengin, E., F. Chalajour, U.M. Gehling, W.D. Ito, H. Treede, H. Lauke, J. Weil, H. Reichenspurner, N. Kilic, and S. Ergun (2006)Vascular wall resident progenitor cells: a source for postnatal vasculogenesis. *Development* 133: p. 1543-51.
60. Alvarez, D.F., L. Huang, J.A. King, M.K. ElZarrad, M.C. Yoder, and T. Stevens (2008)Lung microvascular endothelium is enriched with

- progenitor cells that exhibit vasculogenic capacity. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 294: p. L419-30.
61. Naito, H., H. Kidoya, S. Sakimoto, T. Wakabayashi, and N. Takakura (2011) Identification and characterization of a resident vascular stem/progenitor cell population in preexisting blood vessels. *Embo J* 31: p. 842-55.
  62. Battinelli, E.M., B.A. Markens, and J.E. Italiano, Jr. (2011) Release of angiogenesis regulatory proteins from platelet alpha granules: modulation of physiologic and pathologic angiogenesis. *Blood* 118: p. 1359-69.

**Table 1 : Clinical characteristics**

	<b>20-30 years old (n = 13)</b>	<b>60-70 years old (n = 13)</b>	<b>P-value</b>
Age (years)	23.2 +/- 1.5	65.9 +/- 3.0	<.0001
Male gender	13 ( 100.00%)	13 ( 100.00%)	-
Height (cm)	183.2 +/- 5.3	173.2 +/- 7.1	0.0005
Weight (kg)	80.9 +/- 8.8	77.7 +/- 10.8	NS
Body Mass Index (g.m <sup>-2</sup> )	24.2 +/- 2.5	25.8 +/- 2.5	NS
Waist circumference (cm)	82.8 +/- 8.2	90.4 +/- 6.9	0.0275
Hip circumference (cm)	94.8 +/- 5.4	96.1 +/- 6.3	NS

Data are expressed as mean and standard deviation (in brackets, separated by a semicolon).

**Table 2 : Pharmacological assessment of the endothelial function**

	<b>20-30 years old (n = 13)</b>	<b>60-70 years old (n = 13)</b>	<b>P-value</b>
<b>Arterial parameters</b>			
Heart rate (bpm)	59.1 +/- 6.8	58.8 +/- 7.6	NS
Systolic blood pressure (SBP) (mmHg)	115.2 +/- 5.8	127.7 +/- 10.0	0.0022
Diastolic blood pressure (DBP) (mmHg)	58.9 +/- 5.3	73.0 +/- 6.1	<0.0001
Carotid external diameter at end diastole (μm)	6520 +/- 450	7460 +/- 650	0.001
Carotid pulsatility (μm)	720 +/- 120	324 +/- 142	<0.0001
Carotid intima-media thickness (IMT) (μm)	433 +/- 45	704 +/- 119	<0.0001
Carotid pulse pressure (PP) (mmHg)	41.2 +/- 8.8	46.6 +/- 5.5	NS
AI% Sphygmocor (%)	-1.2 +/- 17.1	34.6 +/- 10.0	<0.0001
Pulse Wave Velocity (PWV) carotido-femorale (m.s <sup>-1</sup> )	8.0 +/- 0.9	10.8 +/- 1.8	0.0002
<b>Endothelium independant vasodilatation (GTN)</b>			
GTN-Baseline brachial artery diameter (μm)	4538 +/- 553	4835 +/- 568	
Post-GTN brachial artery diameter (μm)	5105 +/- 522	5582 +/- 448	
<i>Change in artery diameter vs baseline (μm)</i>	568 (466;670)*	748 (646;850)*	0.03
<b>Flow-mediated vasodilatation</b>			
Baseline brachial artery diameter (μm)	4545 +/- 506	4886 +/- 528	
Ischemic brachial artery diameter (μm)	4511 +/- 446	4777 +/- 594	
Hyperhemia brachial artery diameter (μm)	4850 +/- 542	4987 +/- 548	
<i>Change in artery diameter vs ischemia (μm)</i>	339 (237;441)	210 (108;312)	

Data are expressed as mean and standard deviation (in brackets, separated by a semicolon).

**Table 3 : Biological parameters at baseline and under local ischemia.**

	20-30 years old				60-70 years old				Group effect	Period effect
	P1	P2	P3	P4	P1	P2	P3	P4		
<b>Microparticules (MPs) (count/μL)</b>										
Total MPs (TMPs)	459 [ 328; 1471]	434 [ 336; 1414]	727 [ 474; 1621]	513 [ 287; 803]	289 [ 134; 396]	378 [ 285; 1051]	504 [ 284; 778]	714 [ 406; 839]	<b>NS</b>	<b>NS</b>
Platelet-derived MPs (PMPs)	307 [ 192; 622]	392 [ 341; 770]	514 [ 291; 1634]	495 [ 258; 881]	160 [ 96; 241]	290 [ 151; 705]	284 [ 168; 651]	357 [ 301; 454]	<b>0.015</b> 20-30>60-70 yo	<b>0.0192</b> P2,P3 et P4>P1
Platelet-derived MPs AnV+ (PMPs-AnV+)	165 [ 53; 235]	216 [ 141; 644]	473 [ 206; 1367]	311 [ 126; 630]	71 [ 33; 107]	176 [ 112; 576]	199 [ 99; 551]	290 [ 214; 369]	<b>NS</b>	<b>0.0203</b> P2,P3 et P4>P1
Endothelial MPs (EMPs)	18.8 [ 13.3; 20.3]	16.5 [ 12.5; 23.2]	13.6 [ 9.4; 18.3]	13.2 [ 6.1; 20.3]	17.2 [ 12.1; 28.2]	23.9 [ 14.5; 32.3]	28.9 [ 18.9; 38.5]	16.1 [ 9.2; 27.3]	<b>NS</b>	<b>NS</b>
<b>Circulating Endothelial Cells (CECs) (/mL)</b>										
	0.0 [ 0.0; 1.0]	2.0 [ 1.0; 3.0]	1.0 [ 0.0; 3.0]	0.0 [ 0.0; 3.0]	0.0 [ 0.0; 1.0]	1.0 [ 0.0; 6.0]	1.0 [ 0.0; 2.0]	0.0 [ 0.0; 1.0]	-	-
CEC > 0/mL N (%)	4 ( 30.8%)	10 ( 76.9%)	9 ( 69.2%)	5 ( 38.5%)	5 ( 38.5%)	9 ( 69.2%)	7 ( 53.9%)	6 ( 46.2%)	<b>NS</b>	<b>0.0211</b> P2>P1
<b>Angiogenic populations</b>										
Circulating Progenitor Cells (CPCs) (/mL)	1722 [ 1323; 2892]	1875 [ 1315; 2729]	1490 [ 943; 2389]	1471 [ 1246; 2101]	1086 [ 755; 1331]	1292 [ 1034; 1608]	1195 [ 938; 1668]	1090 [ 835; 1767]	<b>NS</b>	<b>NS</b>
Haematopoietic Progenitor Cells (HPCs) (/mL)	2031 [ 1348; 3690]	2001 [ 1621; 3112]	2195 [ 1546; 3167]	1744 [ 1482; 2667]	1320 [ 949; 1507]	1477 [ 1105; 1862]	1442 [ 1190; 1810]	1199 [ 1114; 1770]	<b>0.0384</b> 20-30>60-70 yo	<b>NS</b>
Endothelial Progenitor Cells (EPCs) (/mL)	15.7 [ 0.0; 28.4]	7.6 [ 0.0; 13.5]	10.0 [ 0.0; 22.8]	12.8 [ 5.2; 37.4]	26.1 [ 5.9; 41.8]	18.4 [ 12.2; 20.9]	16.5 [ 7.7; 78.9]	15.9 [ 8.6; 56.1]	<b>NS</b>	<b>NS</b>
Endothelial Colony-Forming Cells (ECFCs) (/106 MNCs)	0.000 [ 0.000; 0.013]	0.013 [ 0.000; 0.020]	0.013 [ 0.000; 0.026]	0.000 [ 0.000; 0.013]	0.017 [ 0.000; 0.040]	0.000 [ 0.000; 0.020]	0.020 [ 0.000; 0.030]	0.020 [ 0.000; 0.120]	<b>NS</b>	<b>NS</b>

Data are expressed as median and interquartile range (in square brackets, separated by a semicolon).

Figure 1

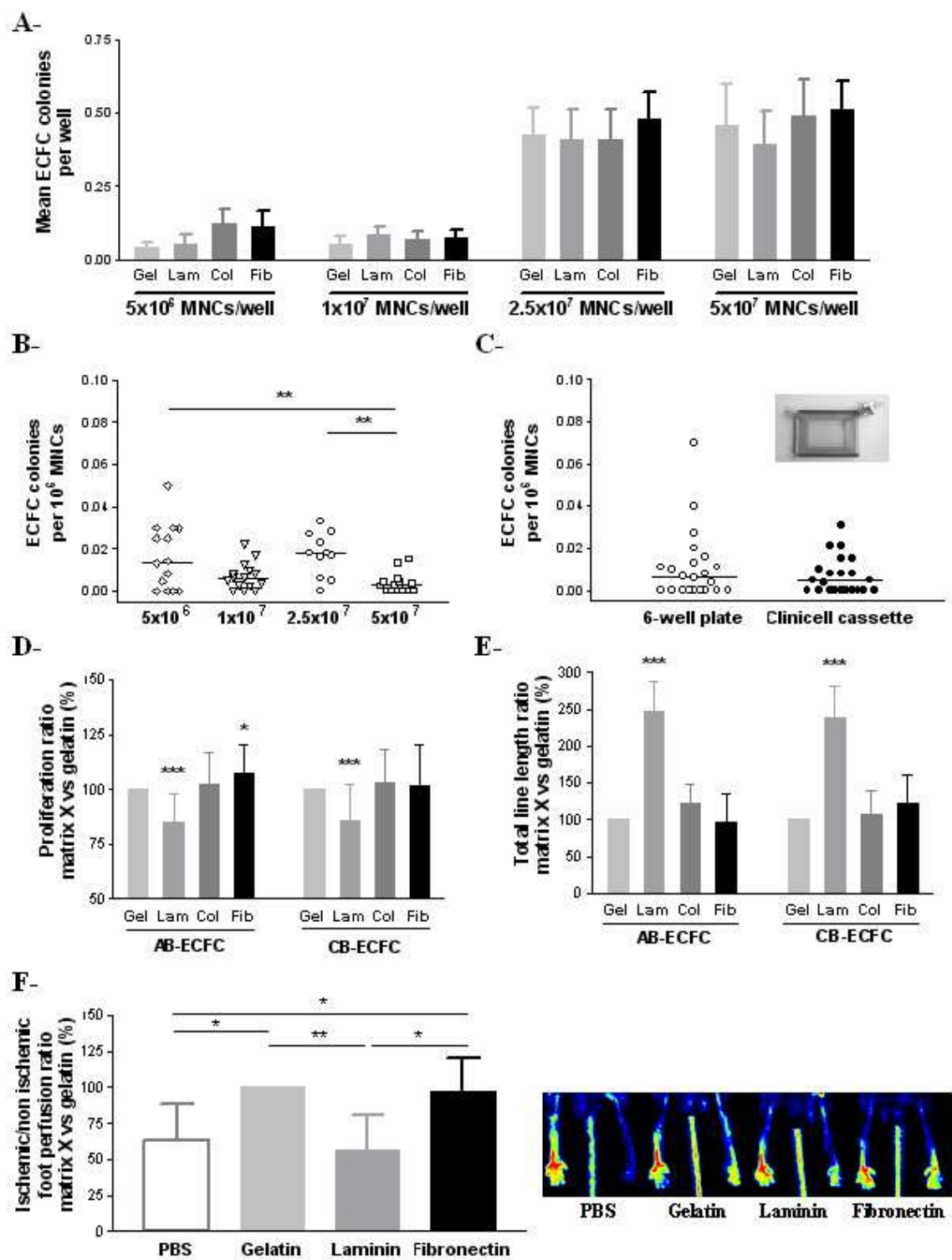


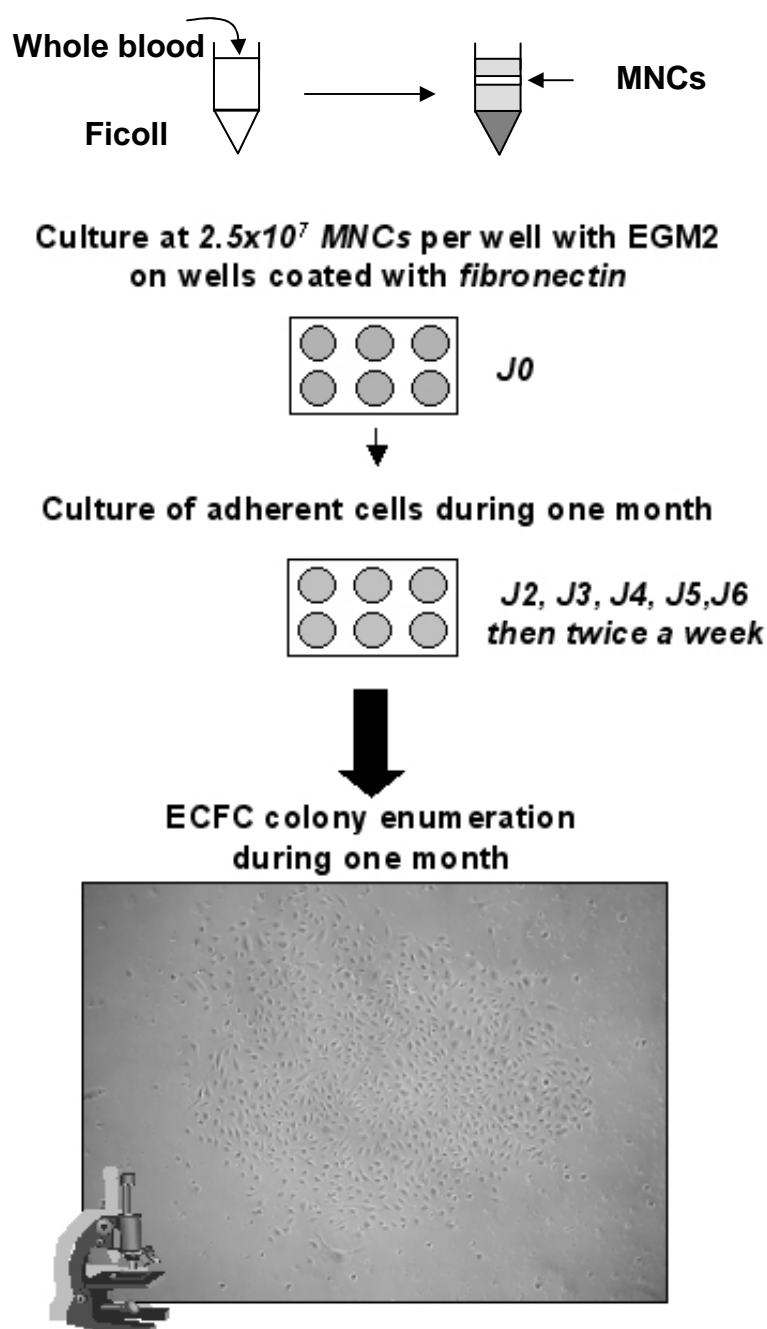
Figure 1. Optimization of ECFC isolation.

**Optimization of ECFC commitment.** A- MNCs isolated from 42 recused blood donations were cultured on four different matrices (gelatin, laminin, collagen and fibronectin) at

different seeding densities. The number of ECFC colonies per well after one month is reported for each seeding density:  $5 \times 10^6$  MNCs per well (N=10),  $1 \times 10^7$ /well (N=12),  $2.5 \times 10^7$ /well (N=10),  $5 \times 10^7$ /well (N=10). B- As no differences were observed between the matrices, all results obtained with a given seeding density were pooled and expressed as the number of ECFC colonies per  $10^6$  MNCs. C- AB-ECFC commitment in Clinicell<sup>®</sup> cassette was compared to that in six-well plates, in the optimal culture conditions proposed (N=20). **D- Impact of the matrix on the proliferation of ECFCs.** The proliferation of the AB-ECFCs (N=14) and CB-ECFCs (N=17) was evaluated after 48 hours of culture on each matrix (gelatin, laminin, collagen and fibronectin) in parallel. For all experiments, results were given relative to gelatin. **E- Impact of the matrix on the differentiation potential of ECFCs.** After 48 hours of culture on the four matrices tested, AB-ECFCs (N=3) and CB-ECFCs (N=3) were seeded in Matrigel<sup>™</sup> in four experiments. Results were given relative to gelatin. **F- Impact of the matrix on the *in vivo* angiogenic potential of ECFCs.** The ischemic versus non ischemic foot perfusion ratio was evaluated 14 days after injection of PBS (N=12) or  $1.10^5$  CB-ECFCs cultured 48 hours on gelatin (N=6), laminin (N=8) or fibronectin (N=6).



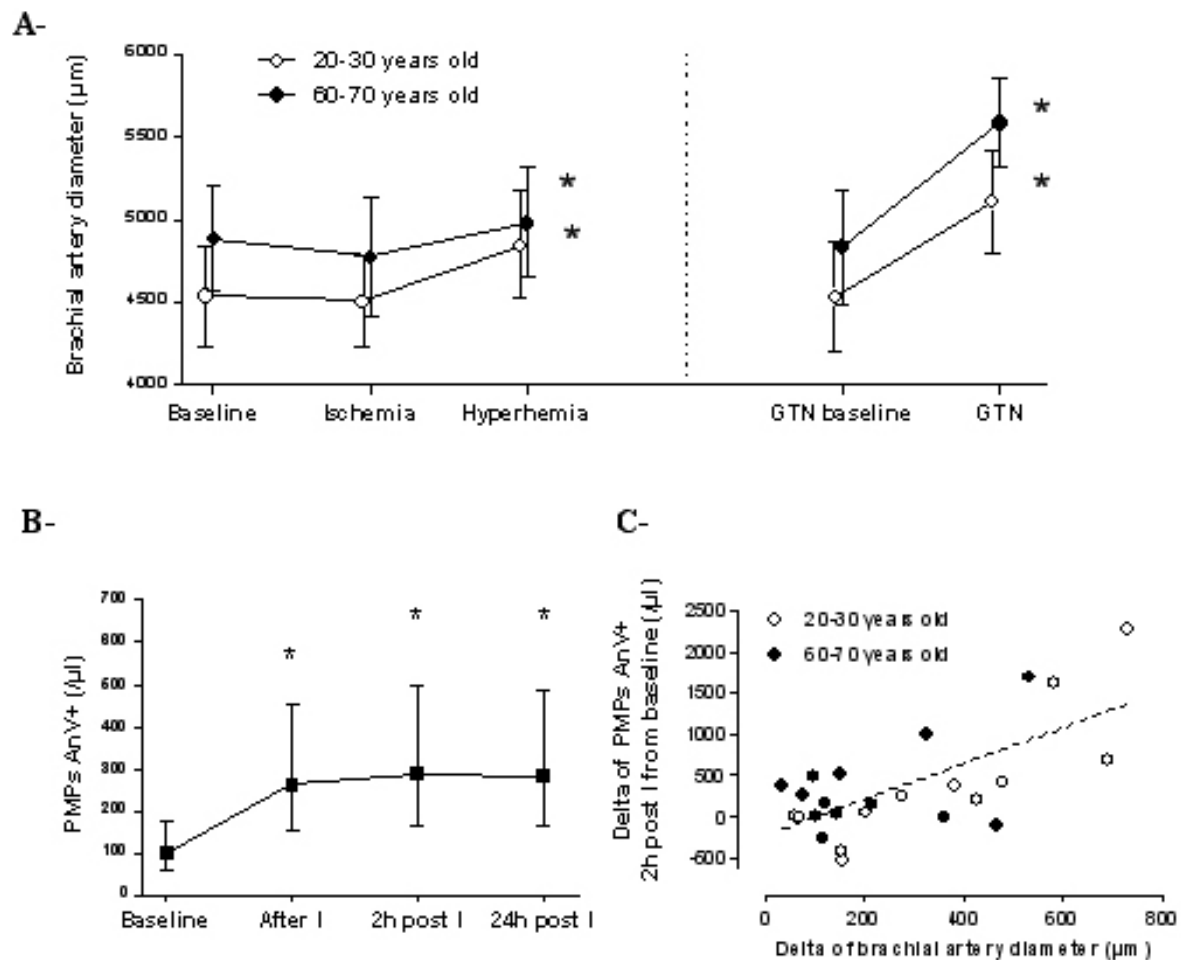
**Figure 2**



**Figure 2. Proposal of a standardized AB-ECFC culture procedure.**

MNCs isolated from peripheral blood by gradient centrifugation are seeded on fibronectin at a density of  $2.5 \times 10^7$  cells per well in EGM2. The culture medium is changed at day 2, every day for five days and then twice a week for one month. ECFC colonies are counted by visual inspection with an inverted microscope at 5X magnification, once a week for 1 month.

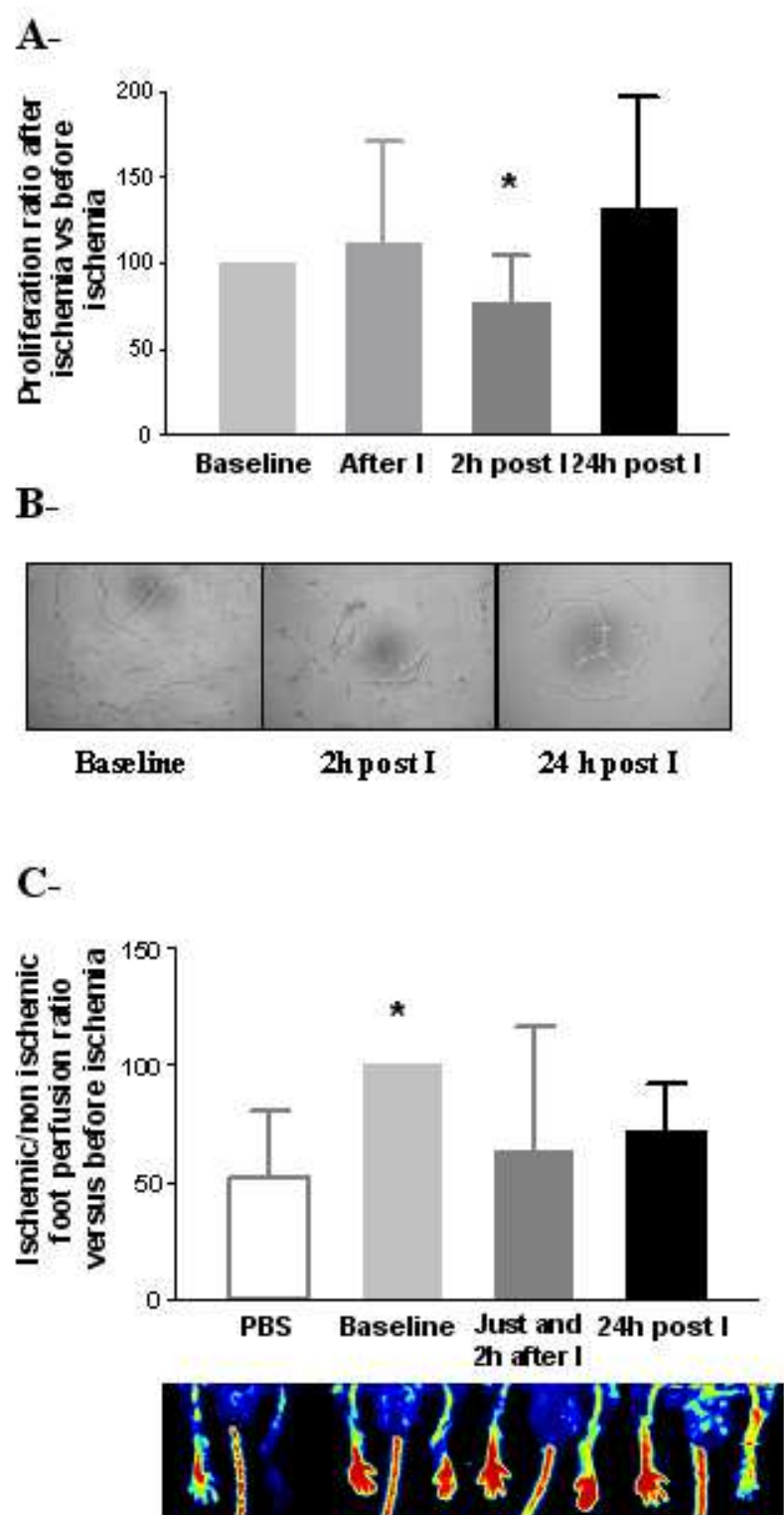
**Figure 3**



**Figure 3. Impact of ischemia on pharmacological and biological parameters of endothelial function.**

A- Flow-mediated and endothelial independent vasodilation of brachial artery was evaluated by echotracking before (baseline), during (ischemia) and after (hyperhemia) the forearm ischemia procedure, 30 minutes of rest later (GTN baseline) and two minutes after GTN sublingual administration (GTN). Results are expressed as mean  $\pm$  sd of the delta of brachial artery diameter ( $\mu$ m). Data for the 20- to 30-year-old group are represented by  $\circ$ , that for 60- to 70-year-old group are represented by  $\bullet$ . B- Platelet-derived microparticles AnV+ were quantified by flow cytometry the day before ischemia, just after the procedure, two hours later and the following day. Results are expressed as geometric mean  $\pm$  confidence intervals 95%. C- The delta of PMPs An V+ at 2 hours post ischemia from baseline expressed per  $\mu$ L was correlated with the delta change of the brachial artery diameter with  $p=0.0202$  and  $r=0.462$ . Data for the 20- to 30-year-old group are represented by  $\circ$ , that for 60- to 70-year-old group are represented by  $\bullet$ .

Figure 4



**Figure 4. Impact of local ischemia on ECFC angiogenic properties**

A- The proliferation potential of healthy volunteer ECFCs was evaluated the day before ischemia (baseline), just after the procedure, two hours later and the following day. Optical densities were expressed relative to the results obtained at baseline. B- Pictures of tube formation at different times of the procedure are presented. C- The *in vivo* angiogenic potential of healthy volunteer ECFCs was evaluated the day before ischemia (baseline), after the procedure (just after and 2 hours later) and the following day. Ischemic/non ischemic reperfusion ratio examined on day 14 was normalized to that obtained at baseline.

## **DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES**

Ce travail est le résultat d'une approche translationnelle destinée à caractériser les différents partenaires du compartiment endothélial circulant pour évaluer la compétence vasculaire, soit la balance lésion/régénération de l'endothélium, dans différentes situations physiopathologiques comme le vieillissement et l'HTP. D'autre part, nous avons tenté d'optimiser la numération, l'isolement et la mobilisation par ischémie locale des ECFC dans le but de développer un produit de thérapie cellulaire.

### **Partie 1 : Exploration du compartiment endothélial circulant dans l'HTP**

#### **Compartiment endothélial circulant et diagnostic de l'HTP**

L'intérêt croissant de la quantification des CEC dans le sang périphérique nous a conduits à mettre en place la technique de référence d'immunoséparation magnétique (IMS) dans le service d'Hématologie Biologique de l'HEGP, en collaboration avec l'équipe de F. Dignat-George et F. Sabatier (U608, Marseille). Elle a été validée dans une population témoin de l'HEGP et par la réalisation de gammes de recouvrement.

Les deux études d'exploration du compartiment endothélial circulant ont apporté un premier résultat intéressant bien que surprenant, soit l'absence de différence significative entre les numérations réalisées dans le sang périphérique et les sites pulmonaires. Une diminution du nombre de CEC en périphérie était attendue par un mécanisme de clairance des CEC au niveau pulmonaire, hépatique ou splénique. On pourrait penser alors que ces CEC soient d'origine systémique et non liées à la pathologie pulmonaire. Cependant, une équipe ayant quantifié les CEC dans l'HTP, a montré que 54% d'entre elles exprimaient le CD36, marqueur de la microcirculation pulmonaire (Bull 2003). Le sang périphérique, reflet du site pulmonaire, permet alors un accès aisé aux différents marqueurs du compartiment endothélial circulant, du moins pour les pathologies pulmonaires étudiées dans ce travail.

Alors que de nombreux travaux ont exploré le versant de la réparation vasculaire, une seule étude à notre connaissance s'est intéressée aux CEC dans l'HTP (Bull 2003). Les résultats que nous avons obtenus chez les adultes et les enfants suggèrent qu'une augmentation des CEC est spécifique des formes d'HTAP associées à un remodelage vasculaire majeur, telles que l'HTAPI et les formes irréversibles d'HTAP secondaire à une cardiopathie congénitale. Les CEC quantifiées dans le sang périphérique sont d'ailleurs un marqueur non invasif d'irréversibilité de l'HTAP associée aux cardiopathies congénitales et

pourraient orienter la prise en charge thérapeutique de ces patients. L'absence de corrélation des CEC avec les paramètres hémodynamiques suggère que leur libération est liée au type de lésions histologiques, soit la présence de lésions plexiformes, et non à la sévérité hémodynamique de la maladie. Bien que Bull et al aient conclu à une augmentation du nombre de CEC à la fois dans l'HTAPI et dans les HTP secondaires, leurs résultats concordent avec ceux que nous avons observés (Bull 2003). En effet sous le terme HTP secondaire étaient regroupées des HTP du groupe 2 à 4 et des HTAP secondaires. Quand on reprend les résultats de cette étude par patient, on observe en fait que seuls ceux qui avaient une HTAP secondaire, dont les formes sévères sont susceptibles de développer des lésions plexiformes tout comme l'HTAPI, présentaient une augmentation des CEC. De plus, la corrélation entre les CEC et la PAP, non observée dans nos études, pourrait s'expliquer par une PAP significativement plus élevée chez les patients avec une HTAP que chez ceux avec une HTP secondaire. La PAPm n'a d'ailleurs pas de valeur pronostique (Sanchez 2010).

Toutefois, deux limites doivent être évoquées pour l'interprétation de nos résultats. Nous avons en effet évoqué l'absence de normes de CEC dans les populations pédiatriques. L'établissement de valeurs normales pour chaque tranche d'âge s'avère nécessaire afin de confirmer ces résultats. D'autre part, la persistance des anomalies hémodynamiques dans l'HTP postembolique peut conduire au développement de lésions sévères type lésions plexiformes. En l'absence de biopsie dans cette étude, on ne peut conclure sur la spécificité de l'augmentation des CEC dans l'HTAP. Soit les CEC sont réellement spécifiques de l'HTAP, soit aucun des patients du groupe HTP postembolique ne présentait de manifestations histologiques sévères. Ceci ne remet pas en cause le lien entre les CEC et le type de lésion histologique, mais ne permet pas d'exclure une élévation des CEC en dehors des HTAP. Ces résultats restent à confirmer sur de plus grandes cohortes de patients.

L'origine précise des CEC reste indéterminée. Un phénomène d'apoptose initiale est nécessaire pour sélectionner des cellules résistantes à l'apoptose, responsables de la formation des lésions plexiformes (Sakao 2009). Les CEC pourraient donc se détacher par la perte des contacts intercellulaires suite à l'apoptose ou lors de l'hyperprolifération anarchique de ces cellules, sous l'effet de forces de cisaillement importantes. Elles proviendraient ainsi du remodelage vasculaire comme il a été observé dans le processus d'angiogenèse tumorale. Cette hypothèse permettrait d'expliquer la persistance des CEC à un même taux dans les vaisseaux pulmonaires et périphériques ; en effet des cellules de type prolifératif et donc non apoptotique seraient éliminées moins rapidement de la circulation, par augmentation de leur

demi-vie. L'étude phénotypique des CEC est envisagée afin de déterminer leur mécanisme de détachement (apoptose ou hyperprolifération), ainsi que leur origine vasculaire. Elle pourrait être réalisée après isolement par IMS puis immunofluorescence, ou bien par l'utilisation du CELLTrack® (Veridex) ou de la RT-PCR (reverse transcription-polymerase chain reaction), le délai de conservation des échantillons avec ces deux technologies étant plus important. Une étude a ainsi montré des profils d'expression génétique différents entre les CEC isolées de contrôles et celles de patients présentant des cancers métastasés (Smirnov 2006). La PCR a même été utilisée pour la quantification des CEC dans le cancer (Furstenberger 2005; Attia 2011). Une étude a cependant montré que la quantification des ARNm des marqueurs endothéliaux couramment utilisés ne permettait pas de détecter les CEC (Strijbos 2010). Une étude comparative de la quantification des CEC par IMS, CF et RT-PCR est actuellement en cours d'analyse.

L'hypothèse d'une origine systémique des CEC lors de la néoangiogenèse a également été envisagée, après observation d'une augmentation des marqueurs d'angiogenèse dans différentes formes d'HTAP avec lésions plexogéniques (Tuder 1998; Levy 2007), l'expression de nombreux facteurs de croissance et la mobilisation de cellules progénitrices dans les modèles animaux (Davie 2004; Hayashida 2005; Satoh 2009). La quantification des cellules progénitrices circulantes chez l'homme a montré des résultats contradictoires (cf tableau VII) pouvant s'expliquer par la diversité des définitions phénotypiques des PEC, l'utilisation de techniques différentes de quantification (CF, culture cellulaire), les populations étudiées, le stade de la pathologie ainsi que le traitement en cours. De plus, des mécanismes inflammatoires et immunitaires contribuent au développement de la maladie pulmonaire, se caractérisant par la mobilisation de cellules dérivées de la moelle osseuse. Il est possible que l'expression croisée de certains marqueurs par les différents types de cellules infiltrées compromettent la compréhension du rôle des PEC dans l'HTAP. Nos observations diffèrent de celles rapportées dans le tableau VII, accentuant d'avantage l'hétérogénéité des résultats. En effet, dans l'étude réalisée chez les adultes, aucune différence significative n'a été mise en évidence entre les groupes d'HTP et les contrôles lors de la quantification des CFU-EC et des CPC. Dans l'HTAP associée aux cardiopathies congénitales, aucune différence significative n'a été montrée pour les CPC entre les groupes. Ainsi, aucun lien n'a pu être établi ici entre une mobilisation systémique et le remodelage vasculaire. Cependant, dans cette étude, l'âge des patients entre les groupes est nettement différent. D'autre part, la représentativité des CPC (CD34+CD133+) par rapport aux PEC a été récemment mise en doute (cf § III.2.2).

L'absence d'augmentation du VEGF ne permet pas non plus d'exclure la mobilisation de PEC à partir de la moelle osseuse. En effet, c'est le VEGF plaquettaire qui est augmenté dans l'HTAP or les dosages ont été réalisés sur du plasma, qui détecte le VEGF des plaquettes activées seulement, et non du sérum (Eddahibi 2000). De plus, d'autres études ont montré une mobilisation des PEC par le sildénafil (Diller 2008), les statines (Vasa 2001) et les inhibiteurs de l'enzyme de conversion (Min 2004) sans augmentation du VEGF. La E-sélectine soluble serait une molécule clé pour le homing des PEC (Oh 2007), en plus d'être un marqueur d'activation endothéliale, et elle est justement augmentée dans notre étude. La néoangiogenèse pourrait également être le reflet de la prolifération de CE matures in situ ou de la présence d'un pool de cellules souches résidentes au niveau pulmonaire (Ingram 2004). Alvarez et al ont d'ailleurs montré que les CE des microvaisseaux pulmonaires de rat contenaient une quantité importante de HPP-ECFC, montrant l'existence de progéniteurs endothéliaux microvasculaires résidents qui conservent leur spécificité fonctionnelle de cellules microvasculaires (Alvarez 2008). Ainsi, bien qu'aucun lien n'ait pu être établi ici entre une mobilisation systémique des progéniteurs et le remodelage vasculaire, ce mécanisme ne peut être exclu. La nécessité de prélèvement sanguin conséquent pour la numération des ECFC a été une limite à leur étude dans le protocole pédiatrique, la comparaison des 3 sites de prélèvement étant déjà en cours d'évaluation. La quantification des ECFC ainsi que l'étude de leurs propriétés angiogéniques est donc à envisager afin d'apporter de nouveaux éléments dans la compréhension du mécanisme d'angiogenèse observée dans les formes sévères d'HTAP.

#### Compartiment endothélial circulant et traitement de l'HTAP

La diminution des CEC en réponse au traitement par bosentan observée chez trois patients adultes suggère un intérêt de la quantification des CEC dans l'évaluation de l'efficacité du traitement. La diminution de la résistance pulmonaire pourrait diminuer le détachement des cellules ou limiter leur caractère prolifératif. L'absence de corrélation entre les paramètres hémodynamiques et le nombre de CEC n'est pas en faveur de la première de ces hypothèses. Cependant, la recherche de la corrélation doit être réalisée au sein de la population susceptible de développer une forme sévère d'HTAP. Si l'on considère que la prolifération anarchique des CE au sein des lésions plexiformes conduit à leur libération, indépendamment des forces de cisaillement, on peut penser que les CEC proviennent d'une prolifération active des cellules au niveau pulmonaire, et non de lésion stable. Une étude est actuellement en cours pour évaluer l'intérêt des CEC dans le suivi de l'efficacité des



traitements. Si ces observations sont confirmées, les CEC seraient alors un marqueur d'une forme active de la maladie.

L'effet des traitements sur le versant réparation a été exploré et a montré que chez les patients pédiatriques recevant du tréprostinil, les ECFC augmentaient ainsi que leurs propriétés angiogéniques *in vitro* et *in vivo*. Ces résultats sont en accord avec des études récentes décrivant un effet pro-angiogène de la prostacycline *in vitro* et *in vivo* chez l'animal passant par PPAR $\delta$  et la synthèse du VEGF, et non par le récepteur IP (Piqueras 2007; He 2008). Une augmentation du nombre de CFU-EC a également été observée après 4 semaines de traitement par l'iloprost chez des patients souffrant d'artériopathie des membres inférieurs (Di Stefano 2008). Ces observations sont en faveur d'un rôle bénéfique des PEC dans l'HTAP.

Toutefois, le rôle bénéfique ou délétère des progéniteurs endothéliaux dans l'HTAP reste discuté. Comme il a été rappelé précédemment, les résultats des études observationnelles sont contradictoires. Les études interventionnelles, bien que contradictoires également, apportent quelques éléments de réponse quant au rôle des deux types de PEC.

Seuls les essais réalisés dans le modèle d'HTAP induite par la MCT rapportent un bénéfice de l'injection de progéniteurs. Ce modèle a récemment été critiqué à cause de sa nature inflammatoire. Une accumulation de CMN de l'inflammation dans l'adventice des petits vaisseaux a en effet été observée (Stenmark 2009). La population cellulaire majoritairement utilisée dans les essais correspond aux PEC précoces, qui contiennent des cellules de la lignée lymphoïde et monocyttaire. Leur effet dans le modèle d'HTAP induite par MCT pourrait alors s'exercer par un mécanisme de modulation immunologique et non par une contribution directe dans la réparation endothéliale. Ormiston et al ont d'ailleurs montré que l'injection de PEC précoces conduisait à la stimulation de cellules NK *in vitro*. Ce mécanisme était indispensable à leur activité *in vivo* comme le montrait la diminution de leur effet lors de l'inhibition des cellules NK dans un modèle d'HTAP induite par la MCT chez le rat (Ormiston 2009). De plus, les cellules utilisées dans les deux essais cliniques de thérapie cellulaire publiés s'apparentent aux PEC précoces. Burnham et al ont montré une association positive entre le nombre de PEC précoces et la survie de patients atteints de pathologies pulmonaires caractérisées par une atteinte sévère de l'endothélium pulmonaire (Burnham 2005). Ainsi, ces PEC semblent exercer un effet bénéfique mais dont le mécanisme reste à explorer, la modulation de l'inflammation ayant certainement un rôle important.

Une seule étude a évalué le bénéfice thérapeutique des ECFC dans le modèle d'HTAP induite par MCT et n'a montré aucune amélioration (Ormiston 2009). D'autre part, le rôle des PEC dans les phénomènes de néoangiogenèse observés au niveau des lésions plexiformes n'est pas clairement établi. Il peut être bénéfique car permettant la formation de nouveaux vaisseaux face à l'occlusion des petites artères par les lésions. A l'inverse, la monoclonalité des foyers de CE décrite dans l'HTAPI suggère un rôle délétère par l'apport de cellules capables de proliférer et représentant une source potentielle pour la prolifération anarchique des cellules correspondant aux lésions plexiformes. Mais cet aspect ne peut être évalué dans les modèles animaux car ils ne développent pas de lésions plexiformes (Stenmark 2009). Ainsi, un effet néfaste des PEC ne peut être exclu. De plus, aucun lien n'a été établi entre l'effet proangiogénique des prostanoïdes et leur efficacité dans le traitement de l'HTAP. Or une étude récente suggère que l'effet thérapeutique de ces molécules ne serait pas lié à la stimulation de l'angiogenèse (Palange 2006). Achcar et al n'ont pas montré de différence dans les lésions pulmonaires entre les patients sous prostacycline et ceux n'en ayant pas (Achcar 2006). Une corrélation positive entre la largeur des lésions et la durée du traitement par prostacycline a même été rapportée (Palange 2006), n'empêchant pas un effet bénéfique de la prostacycline par ses autres propriétés.

Compte tenu de l'existence d'une hiérarchie dans les capacités de prolifération des progéniteurs avec l'âge et de leur faible nombre en circulation, la population pédiatrique est une population intéressante pour développer l'utilisation de PEC autologues. Cependant, ces patients développent surtout des HTAPI et des HTAP secondaires aux cardiopathies congénitales. Ces formes étant souvent associées à la présence de lésions plexiformes, les observations faites ci-dessus imposent d'aller plus avant dans la détermination du rôle exact des PEC dans la formation de ces lésions avant d'envisager l'utilisation des ECFC comme traitement de l'HTP dans cette population. Des études observationnelles évaluant la quantité et la fonctionnalité des ECFC en fonction des formes d'HTAP, du statut clinique du patient, leur évolution au cours du traitement et du remodelage pulmonaire s'avèrent nécessaire pour statuer sur un éventuel intérêt comme produit de thérapie cellulaire ou sur l'orientation vers des molécules anti-angiogéniques.

## **Partie 2 : Développement d'un produit de thérapie cellulaire**

### **Optimisation de l'isolement des ECFC**

Compte-tenu de la diversité des conditions de culture des ECFC, leur étude a nécessité une étape d'optimisation des conditions d'ensemencement, au cours de laquelle un impact négatif de la laminine sur les propriétés angiogéniques des PEC a été observé. Cette matrice n'est donc pas adaptée à l'expansion des ECFC et doit être également rejetée lorsque des études fonctionnelles des ECFC isolés sont envisagées. L'étude de l'expression des intégrines par cytométrie en flux a montré une surexpression des chaînes  $\alpha_6$  et  $\alpha_2$ , l'intégrine  $\alpha_6\beta_1$  étant le récepteur majoritaire de la laminine (données non présentées). L'augmentation des propriétés angiogéniques observées en Matrigel, milieu tri-dimensionnel essentiellement composé de laminine, peut alors s'expliquer par un préconditionnement des cellules 48h avec la laminine induisant une surexpression de l'intégrine  $\alpha_6\beta_1$ . La laminine est en effet connue pour promouvoir la différenciation des CE et leur stabilité (Davis and Senger 2005). A l'inverse la fibronectine et le collagène stimulent la prolifération cellulaire, mais aucune différence n'a été observée lors de l'utilisation de ces deux matrices et de la gélatine, comme le confirme l'absence de surexpression de la chaîne  $\beta_1$  ou de l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$ . Aux termes de ce travail, nous avons défini des conditions de culture pour la numération des ECFC, dont les matrices appropriées ainsi que le nombre de CMN à ensemer.

L'utilisation d'une technique de culture consensuelle faciliterait la comparaison entre les études cliniques, déjà limitée par la diversité des définitions des PEC. D'autre part, la méthode proposée a été validée dans un système de culture cellulaire de grade clinique, permettant de réaliser une expansion cellulaire destinée à l'usage humain, une fois les milieux de culture et la matrice utilisés qualifiés de grade clinique. Bien que les rendements obtenus avec les conditions définies soient similaires à ceux rapportés par Yoder, une équipe de référence dans le domaine, ils sont faibles et une utilisation thérapeutique autologue implique une stratégie de mobilisation des ECFC avant le prélèvement.

La population cible des essais de thérapie cellulaire est majoritairement âgée. Le vieillissement étant associé à une dysfonction endothéliale, nous avons exploré son effet sur le compartiment endothélial circulant.

#### Impact du vieillissement sur l'endothélium

Malgré l'augmentation de la rigidité artérielle, nous n'avons pas observé de perte de réactivité endothéliale, contrairement à ce qui est rapporté. Plusieurs raisons peuvent expliquer cette divergence dans les résultats des FMD. Plusieurs méthodes sont disponibles, pléthysmographie avec injection d'ACh ou FMD, et impliquent des mécanismes différents

d'induction de la dilatation (Mullen 2001). La normalisation des résultats de la FMD peut également conduire à des conclusions différentes (Wray 2006). De plus, la FMD est une évaluation locale de la réactivité endothéliale. L'hétérogénéité des vaisseaux dans la susceptibilité à l'athérosclérose et à la dysfonction endothéliale (Newcomer 2004) ne permet donc pas de généraliser ce résultat à l'ensemble du réseau vasculaire. L'absence de différence au niveau du compartiment endothélial circulant entre les deux populations d'individus sains d'âges différents est cohérente avec la préservation de la réactivité endothéliale. Pour compléter notre étude, une quantification des MPE a été réalisée et leur taux est corrélé aux marqueurs de la fonction endothéliale dans chaque groupe de sujets. Des divergences existent dans les résultats rapportés concernant la quantification des PEC pour les mêmes raisons que dans l'HTAP. Les définitions phénotypiques, méthodes utilisées (cytométrie en flux ou culture) ainsi que l'expression des résultats, par ml de sang ou en % de CMN peuvent expliquer ces divergences. Malgré ces réserves, l'impact du vieillissement sur les capacités angiogéniques des cellules a été globalement rapporté *in vitro* (Ingram 2004) et dans les études expérimentales animales (Edelberg 2002). Ceci corrobore nos observations dans les études réalisées chez l'enfant et chez l'adulte. Aussi, une étude plus large incluant la nôtre est en cours afin de déterminer des normes pour chaque biomarqueur par tranche d'âge dans la population saine (du sang de cordon à l'âge de 90 ans, projet financé par la FRM et réalisé en collaboration avec l'équipe du Pr F. Dignat-George, Marseille). L'absence d'impact de l'ischémie sur le compartiment endothélial circulant n'exclut pas une différence de l'intégrité endothéliale en termes de réponse face à une agression plus importante avec l'âge. Une étude comparative de la fonctionnalité des progéniteurs serait intéressante mais n'a pas pu être réalisée dans notre étude en raison du faible nombre de colonies obtenues.

#### Mobilisation des ECFC par une ischémie locale

L'hypothèse d'un réservoir d'ECFC vasculaire libéré par ischémie locale n'a pas été vérifiée dans nos conditions opératoires. A l'inverse, une altération des propriétés angiogéniques des ECFC a été observée en post-ischémie, dont les causes sont en cours d'analyse au niveau transcriptomique. Parmi les causes extra-cellulaires, le relargage spécifique de molécules anti-angiogéniques, telles que la TSP-1 (Battinelli 2011), par les plaquettes activées lors de l'ischémie est probable. L'importance de chaque vaisseau en termes de réservoir en cellules progénitrices devrait également être évaluée (Alvarez 2008; Yoder 2010) et explique peut-être, en partie, l'absence de mobilisation endothéliale des PEC.

On peut aussi penser que les PEC résidents soient directement consommés au site d'ischémie et ne circulent pas dans le sang.

En l'absence de mobilisation des cellules progénitrices et de PEC par le processus d'ischémie locale, d'autres stratégies de développement d'un produit de thérapie cellulaire doivent être envisagées. Une méthode d'expansion des PEC permettant d'obtenir des quantités importantes de cellules a été décrite récemment (Reinisch 2009). Dans cette technique, les lysats plaquettaires sont utilisés pour la culture des cellules à partir du sang total. La présence de facteurs proangiogéniques dans ces lysats (Battinelli 2011) explique ce très bon rendement. Une étude récente a montré l'influence de la source autologue ou allogénique du sérum et des cytokines inflammatoires sur les rendements d'isolement des ECFC (Lapidos 2012). Cette technique d'expansion des PEC à grande échelle, non standardisable, n'est donc pas applicable sur un plan diagnostique. D'autres sources d'ECFC, comme le sang de cordon, plus riche en cellules progénitrices (Ingram 2004; Smadja 2006; Smadja 2009) sont également étudiées. Ingram et al ont d'ailleurs montré la présence d'HPP-ECFC dans le sang de cordon et non dans le sang périphérique. De plus, deux groupes ont validé la cryopréservation des ECFC issus du sang de cordon (Vanneaux 2010; Lin 2011). Mais le problème de l'histocompatibilité doit être exploré avant de recommander leur utilisation chez les patients. Enfin l'utilisation de d'autres types cellulaires doit être envisagée, comme les cellules souches mésenchymateuses (CSM). Les CSM isolées de sang de cordon ont en effet permis d'améliorer des patients atteints de la maladie de Buerger (Kim 2006). L'équipe de Baber et al a montré l'efficacité de l'injection de CSM dans l'HTP induite par MCT (Baber 2007). Ces cellules ne s'intègrent pas dans les vaisseaux mais agiraient par un mécanisme paracrine. Les CSM sont faciles à expandre à partir de la moelle osseuse et conservent leurs propriétés angiogéniques dans un modèle animal de pathologies ischémiques du membre inférieur chez l'animal (Smadja 2012), encourageant leur développement comme produit de thérapie cellulaire. Notre groupe s'intéresse également à d'autres cellules à potentiel vasculaire, comme les VSEL (Very Small Embryonic-like stem cells) (Zuba-Surma 2011). D'autres équipes travaillent sur les cellules du tissu adipeux (Planat-Benard 2004).

### **Intérêt de l'exploration du compartiment endothélial circulant**

Pour résumer, nous avons exploré essentiellement les CEC et les PEC dans l'hypertension pulmonaire et le vieillissement. D'après les résultats que nous avons obtenus, ces deux biomarqueurs présentent des intérêts différents mais complémentaires.

Plus qu'un marqueur de lésion comme fréquemment admis, les CEC pourraient être un marqueur du remodelage vasculaire pulmonaire, permettant ainsi d'orienter le diagnostic et donc la prise en charge thérapeutique des patients. D'autre part, ils permettent un accès peu invasif au site pathologique et contribuent ainsi à l'étude des mécanismes physiopathologiques (marqueur d'apoptose, d'activation, d'hyperprolifération) ainsi qu'à la localisation des lésions, les CE exprimant des marqueurs spécifiques des différents sites vasculaires. L'absence d'augmentation significative des CEC après ischémie de l'avant bras est en faveur du rôle des CEC dans un vrai processus d'activation endothéliale. Se pose la question des résultats précédemment retrouvés notamment lors des circonstances post-angioplastie où une augmentation, certes modérée et transitoire, mais significative des CEC a été observée. L'exploration du phénotype des CEC dans ces différentes circonstances pathologiques nous permettra certainement de mettre en évidence l'origine exacte des CEC dans des contextes de remodelage ou de lésion endothéliale.

En ce qui concerne les PEC (notamment les ECFC), l'absence de modification du nombre d'ECFC dans le cadre du remodelage pulmonaire sans intervention pharmacologique ou après ischémie transitoire du bras pourrait indiquer que ces cellules ne proviennent pas du site lésé ou ne seraient pas corrélées aux processus de remodelage vasculaire. Cependant ces cellules pourraient être un reflet de la capacité de l'organisme à réagir face à ces stimuli systémiques. Leur augmentation, notamment dans le cas de l'utilisation d'analogues de la prostacycline, pourrait cependant contribuer à l'amplification des lésions prolifératives, alors néfaste. Leur évolution est donc à interpréter avec d'autres facteurs, mais permettrait d'évaluer le pronostic de la maladie et l'efficacité de certains traitements quand leur contribution dans la physiopathologie est bien définie. Selon leur rôle, néfaste ou bénéfique, ils peuvent être envisagés soit comme cible thérapeutique soit comme produit de thérapie cellulaire. En l'absence d'homogénéisation des nomenclatures et des pratiques, leur implication dans certaines pathologies reste difficile à déterminer. L'amélioration des techniques explorant ces deux paramètres est donc essentielle afin de les exploiter au mieux.

## CONCLUSION

L'exploration du compartiment endothélial circulant a apporté des résultats très prometteurs concernant les CEC, marqueur diagnostique et pronostique des formes sévères d'HTAP. La quantification des CEC a d'ailleurs été intégrée dans les examens de routine réalisés lors de l'exploration des patients. Après confirmation de ces résultats dans des cohortes plus importantes, on pourrait envisager d'associer ce test avec les paramètres cliniques et hémodynamiques afin de faciliter la prise en charge thérapeutique des patients ayant développé une HTAP secondaire aux cardiopathies congénitales. Les résultats obtenus dans l'HTAP comme dans les processus tumoraux suggèrent que les CEC seraient non seulement marqueur de lésion ou d'activation endothéliale mais aussi le témoin de la prolifération anarchique de ces cellules. L'intérêt des CEC et des ECFC dans le suivi de l'efficacité des traitements de l'HTAP est en cours d'évaluation, à la suite de nos résultats montrant un effet pro-angiogénique du tréprostinil sur les ECFC. L'intérêt de ces cellules comme produit de thérapie cellulaire est en cours d'étude.

L'optimisation de l'isolement des ECFC a permis une étude complète de la compétence vasculaire lors du vieillissement. Nous avons ainsi constaté que l'intégrité endothéliale était préservée malgré le vieillissement chez les individus sains. L'établissement de normes par tranches d'âge pour chacun de ces biomarqueurs est actuellement en cours afin de pouvoir aller plus loin dans l'interprétation des résultats et la comparaison des populations.

Toutefois, l'échec de la mobilisation des ECFC par ischémie locale suggère une réorientation du projet vers l'utilisation de d'autres méthodes d'isolement, d'autres sources de cellules voire d'autres types cellulaires.

## ANNEXES

### ANNEXE 1 :

**Blood outgrowth endothelial cells from cord blood and peripheral blood: angiogenesis- related characteristics in vitro'-a rebuttal'.**

Smadja DM, Mauge L, Susen S, Bieche I, Gaussem P. *J Thromb Haemost.* 2009 Mar;7(3):504-6.

[Blood outgrowth endothelial cells from cord blood and peripheral blood: angiogenesis-related characteristics in vitro: a rebuttal.](#)

Smadja DM, **Mauge L**, Susen S, Bieche I, Gaussem P.

*J Thromb Haemost.* 2009 Mar;7(3):504-6; author reply 506-8. No abstract available.

### ANNEXE 2 :

**The Wnt Antagonist Dickkopf-1 Increases Endothelial Progenitor Cell Angiogenic Potential.**

Smadja DM, d'Audigier C, Weiswald LB, Badoual C, Dangles-Marie V, Mauge L, Evrard S, Laurendeau I, Lallemand F, Germain S, Grelac F, Dizier B, Vidaud M, Bièche I, Gaussem P. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2010;30(12):2544-52.

[The Wnt antagonist Dickkopf-1 increases endothelial progenitor cell angiogenic potential.](#)

Smadja DM, d'Audigier C, Weiswald LB, Badoual C, Dangles-Marie V, **Mauge L**, Evrard S, Laurendeau I, Lallemand F, Germain S, Grelac F, Dizier B, Vidaud M, Bièche I, Gaussem P.

*Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2010 Dec;30(12):2544-52. Epub 2010 Sep 16.

### ANNEXE 3 :

**Les cellules endothéliales circulantes et les progéniteurs endothéliaux: produits de thérapie cellulaire ou biomarqueurs des pathologies vasculaires?**

Mauge L, D'audigier C, Gaussem P, Smadja DM.

*Sang Thrombose et Vaisseaux*, 2010, 22 : 289-300. (IF 0,05)

### ANNEXE 4 :

**Thrombospondin-1 is a plasmatic marker of peripheral arterial disease that modulates endothelial progenitor cell angiogenic properties.**



Smadja DM, d'Audigier C, Bièche I, Evrard S, Mauge L, Dias JV, Labreuche J, Laurendeau I, Marsac B, Dizier B, Wagner-Ballon O, Boisson-Vidal C, Morandi V, Duong-Van-Huyen JP, Bruneval P, Dignat-George F, Emmerich J, Gaussem P. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2011 Mar;31(3):551-9.

[Thrombospondin-1 is a plasmatic marker of peripheral arterial disease that modulates endothelial progenitor cell angiogenic properties.](#)

Smadja DM, d'Audigier C, Bièche I, Evrard S, **Mauge L**, Dias JV, Labreuche J, Laurendeau I, Marsac B, Dizier B, Wagner-Ballon O, Boisson-Vidal C, Morandi V, Duong-Van-Huyen JP, Bruneval P, Dignat-George F, Emmerich J, Gaussem P.

*Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2011 Mar;31(3):551-9. Epub 2010 Dec 9.

#### ANNEXE 5 :

**Profibrotic Cytokine TGF- $\beta$ 1 Increases Endothelial Progenitor Cell Angiogenic Properties** Evrard SM, d'Audigier C, Mauge L, Israël-Biet D, Guerin CL, Bieche I, Kovacic JC, Fischer AM, Gaussem P, Smadja DM.. *J Thromb Haemost.* 2012 Jan 27.

[The profibrotic cytokine transforming growth factor- \$\beta\$ 1 increases endothelial progenitor cell angiogenic properties.](#)

Evrard SM, d'Audigier C, **Mauge L**, Israël-Biet D, Guerin CL, Bieche I, Kovacic JC, Fischer AM, Gaussem P, Smadja DM.

*J Thromb Haemost.* 2012 Apr;10(4):670-9. doi: 10.1111/j.1538-7836.2012.04644.x

#### ANNEXE 6 :

**Angiogenic potential of BM MSCs derived from patients with critical leg ischemia.**

Smadja DM, d'Audigier C, Guerin CL, Mauge L, Dizier B, Silvestre JS, Cortivo LD, Gaussem P, Emmerich J. *Bone Marrow Transplant.* 2011 Oct 10.

[Angiogenic potential of BM MSCs derived from patients with critical leg ischemia.](#)

Smadja DM, d'Audigier C, Guerin CL, **Mauge L**, Dizier B, Silvestre JS, Dal Cortivo L, Gaussem P, Emmerich J.

*Bone Marrow Transplant.* 2012 Jul;47(7):997-1000. doi: 10.1038/bmt.2011.196. Epub 2011 Oct 10. No abstract available.

## BIBLIOGRAPHIE

- Achcar, R. O., G. L. Yung, et al. (2006). "Morphologic changes in explanted lungs after prostacyclin therapy for pulmonary hypertension." Eur J Med Res **11**(5): 203-7.
- Adams, V., K. Lenk, et al. (2004). "Increase of circulating endothelial progenitor cells in patients with coronary artery disease after exercise-induced ischemia." Arterioscler Thromb Vasc Biol **24**(4): 684-90.
- Aicher, A., C. Heeschen, et al. (2003). "Essential role of endothelial nitric oxide synthase for mobilization of stem and progenitor cells." Nat Med **9**(11): 1370-6.
- Aicher, A., O. Kollet, et al. (2008). "The Wnt antagonist Dickkopf-1 mobilizes vasculogenic progenitor cells via activation of the bone marrow endosteal stem cell niche." Circ Res **103**(8): 796-803.
- Aicher, A., M. Rentsch, et al. (2007). "Nonbone marrow-derived circulating progenitor cells contribute to postnatal neovascularization following tissue ischemia." Circ Res **100**(4): 581-9.
- Aird, W. C. (2003). "Endothelial cell heterogeneity." Crit Care Med **31**(4 Suppl): S221-30.
- Aird, W. C. (2005). "Spatial and temporal dynamics of the endothelium." J Thromb Haemost **3**(7): 1392-406.
- Aird, W. C. (2006). "Mechanisms of endothelial cell heterogeneity in health and disease." Circ Res **98**(2): 159-62.
- Alessi, M. C. and I. Juhan-Vague (2004). "Contribution of PAI-1 in cardiovascular pathology." Arch Mal Coeur Vaiss **97**(6): 673-8.
- Alvarez, D. F., L. Huang, et al. (2008). "Lung microvascular endothelium is enriched with progenitor cells that exhibit vasculogenic capacity." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **294**(3): L419-30.
- Amabile, N., A. P. Guerin, et al. (2005). "Circulating endothelial microparticles are associated with vascular dysfunction in patients with end-stage renal failure." J Am Soc Nephrol **16**(11): 3381-8.
- Amabile, N., C. Heiss, et al. (2009). "Increased CD62e(+) endothelial microparticle levels predict poor outcome in pulmonary hypertension patients." J Heart Lung Transplant **28**(10): 1081-6.
- Amann, B., C. Luedemann, et al. (2009). "Autologous bone marrow cell transplantation increases leg perfusion and reduces amputations in patients with advanced critical limb ischemia due to peripheral artery disease." Cell Transplant **18**(3): 371-80.
- Anderlini, P. and R. E. Champlin (2008). "Biologic and molecular effects of granulocyte colony-stimulating factor in healthy individuals: recent findings and current challenges." Blood **111**(4): 1767-72.
- Anfosso, F., N. Bardin, et al. (2001). "Outside-in signaling pathway linked to CD146 engagement in human endothelial cells." J Biol Chem **276**(2): 1564-9.
- Asahara, T. and A. Kawamoto (2004). "Endothelial progenitor cells for postnatal vasculogenesis." Am J Physiol Cell Physiol **287**(3): C572-9.

- Asahara, T., H. Masuda, et al. (1999). "Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization." Circ Res **85**(3): 221-8.
- Asahara, T., T. Murohara, et al. (1997). "Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis." Science **275**(5302): 964-7.
- Asahara, T., T. Takahashi, et al. (1999). "VEGF contributes to postnatal neovascularization by mobilizing bone marrow-derived endothelial progenitor cells." Embo J **18**(14): 3964-72.
- Asosingh, K., M. A. Aldred, et al. (2008). "Circulating angiogenic precursors in idiopathic pulmonary arterial hypertension." Am J Pathol **172**(3): 615-27.
- Assmus, B., A. Rolf, et al. (2010). "Clinical outcome 2 years after intracoronary administration of bone marrow-derived progenitor cells in acute myocardial infarction." Circ Heart Fail **3**(1): 89-96.
- Assmus, B., V. Schachinger, et al. (2002). "Transplantation of Progenitor Cells and Regeneration Enhancement in Acute Myocardial Infarction (TOPCARE-AMI)." Circulation **106**(24): 3009-17.
- Atkinson, C., S. Stewart, et al. (2002). "Primary pulmonary hypertension is associated with reduced pulmonary vascular expression of type II bone morphogenetic protein receptor." Circulation **105**(14): 1672-8.
- Attia, F. M., A. Maaty, et al. (2011). "Circulating endothelial cells as a marker of vascular dysfunction in patients with systemic lupus erythematosus by real-time polymerase chain reaction." Arch Pathol Lab Med **135**(11): 1482-5.
- Au, P., L. M. Daheron, et al. (2008). "Differential in vivo potential of endothelial progenitor cells from human umbilical cord blood and adult peripheral blood to form functional long-lasting vessels." Blood **111**(3): 1302-5.
- Baber, S. R., W. Deng, et al. (2007). "Intratracheal mesenchymal stem cell administration attenuates monocrotaline-induced pulmonary hypertension and endothelial dysfunction." Am J Physiol Heart Circ Physiol **292**(2): H1120-8.
- Bahlmann, F. H., K. De Groot, et al. (2004). "Erythropoietin regulates endothelial progenitor cells." Blood **103**(3): 921-6.
- Bailey, A. S., S. Jiang, et al. (2004). "Transplanted adult hematopoietic stems cells differentiate into functional endothelial cells." Blood **103**(1): 13-9.
- Balint, O. H., A. Samman, et al. (2008). "Outcomes in patients with pulmonary hypertension undergoing percutaneous atrial septal defect closure." Heart **94**(9): 1189-93.
- Bardin, N., F. Anfoso, et al. (2001). "Identification of CD146 as a component of the endothelial junction involved in the control of cell-cell cohesion." Blood **98**(13): 3677-84.
- Bardin, N., M. Blot-Chabaud, et al. (2009). "CD146 and its soluble form regulate monocyte transendothelial migration." Arterioscler Thromb Vasc Biol **29**(5): 746-53.
- Bardin, N., V. Frances, et al. (1998). "CD146: biosynthesis and production of a soluble form in human cultured endothelial cells." FEBS Lett **421**(1): 12-4.
- Bardin, N., V. Frances, et al. (1996). "Identification of the S-Endo 1 endothelial-associated antigen." Biochem Biophys Res Commun **218**(1): 210-6.

- Bardin, N., F. George, et al. (1996). "S-Endo 1, a pan-endothelial monoclonal antibody recognizing a novel human endothelial antigen." Tissue Antigens **48**(5): 531-9.
- Bardin, N., V. Moal, et al. (2003). "Soluble CD146, a novel endothelial marker, is increased in physiopathological settings linked to endothelial junctional alteration." Thromb Haemost **90**(5): 915-20.
- Bardin, N., D. Reumaux, et al. (2006). "Increased expression of CD146, a new marker of the endothelial junction in active inflammatory bowel disease." Inflamm Bowel Dis **12**(1): 16-21.
- Barton, M., F. Cosentino, et al. (1997). "Anatomic heterogeneity of vascular aging: role of nitric oxide and endothelin." Hypertension **30**(4): 817-24.
- Bartsch, T., M. Brehm, et al. (2006). "Autologous mononuclear stem cell transplantation in patients with peripheral occlusive arterial disease." J Cardiovasc Nurs **21**(6): 430-2.
- Beghetti, M. (2006). "[Pulmonary hypertension associated with congenital heart disease]." Rev Mal Respir **23**(4 Suppl): 13S49-59; quiz 13S157, 13S159.
- Bernal-Mizrachi, L., W. Jy, et al. (2004). "Endothelial microparticles correlate with high-risk angiographic lesions in acute coronary syndromes." Int J Cardiol **97**(3): 439-46.
- Bernal-Mizrachi, L., W. Jy, et al. (2003). "High levels of circulating endothelial microparticles in patients with acute coronary syndromes." Am Heart J **145**(6): 962-70.
- Blacher, J., B. Pannier, et al. (1998). "Carotid arterial stiffness as a predictor of cardiovascular and all-cause mortality in end-stage renal disease." Hypertension **32**(3): 570-4.
- Blann, A. D., A. Woywodt, et al. (2005). "Circulating endothelial cells. Biomarker of vascular disease." Thromb Haemost **93**(2): 228-35.
- Bolli, R., A. R. Chugh, et al. (2011). "Cardiac stem cells in patients with ischaemic cardiomyopathy (SCIPIO): initial results of a randomised phase 1 trial." Lancet **378**(9806): 1847-57.
- Bompais, H., J. Chagraoui, et al. (2004). "Human endothelial cells derived from circulating progenitors display specific functional properties compared with mature vessel wall endothelial cells." Blood **103**(7): 2577-84.
- Bonello, L., A. Basire, et al. (2006). "Endothelial injury induced by coronary angioplasty triggers mobilization of endothelial progenitor cells in patients with stable coronary artery disease." J Thromb Haemost **4**(5): 979-81.
- Boutouyrie, P. (2008). "New techniques for assessing arterial stiffness." Diabetes Metab **34 Suppl 1**: S21-6.
- Bouvier, C. A. (1970). "Circulating endothelium as an indication of vascular injury." Thrombosis et Diathesis Haemorrhagica Supplement **40**: 163.
- Brandes, R. P., I. Fleming, et al. (2005). "Endothelial aging." Cardiovasc Res **66**(2): 286-94.
- Brodsky, S. V., F. Zhang, et al. (2004). "Endothelium-derived microparticles impair endothelial function in vitro." Am J Physiol Heart Circ Physiol **286**(5): H1910-5.
- Broze, G. J., Jr. (1995). "Tissue factor pathway inhibitor." Thromb Haemost **74**(1): 90-3.

- Buchanan, F. G., W. Chang, et al. (2004). "Up-regulation of the enzymes involved in prostacyclin synthesis via Ras induces vascular endothelial growth factor." Gastroenterology **127**(5): 1391-400.
- Budhiraja, R., R. M. Tuder, et al. (2004). "Endothelial dysfunction in pulmonary hypertension." Circulation **109**(2): 159-65.
- Bull, T. M., H. Golpon, et al. (2003). "Circulating endothelial cells in pulmonary hypertension." Thromb Haemost **90**(4): 698-703.
- Burke, G. L., G. W. Evans, et al. (1995). "Arterial wall thickness is associated with prevalent cardiovascular disease in middle-aged adults. The Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study." Stroke **26**(3): 386-91.
- Burnham, E. L., W. R. Taylor, et al. (2005). "Increased circulating endothelial progenitor cells are associated with survival in acute lung injury." Am J Respir Crit Care Med **172**(7): 854-60.
- Burt, R. K., A. Testori, et al. (2010). "Autologous peripheral blood CD133+ cell implantation for limb salvage in patients with critical limb ischemia." Bone Marrow Transplant **45**(1): 111-6.
- Calleri, A., A. Bono, et al. (2009). "Predictive Potential of Angiogenic Growth Factors and Circulating Endothelial Cells in Breast Cancer Patients Receiving Metronomic Chemotherapy Plus Bevacizumab." Clin Cancer Res **15**(24): 7652-7657.
- Canizo, M. C., F. Lozano, et al. (2007). "Peripheral endothelial progenitor cells (CD133 +) for therapeutic vasculogenesis in a patient with critical limb ischemia. One year follow-up." Cytotherapy **9**(1): 99-102.
- Carmeliet, P. and R. K. Jain (2011). "Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis." Nature **473**(7347): 298-307.
- Carriere, A., T. G. Ebrahimian, et al. (2009). "Preconditioning by mitochondrial reactive oxygen species improves the proangiogenic potential of adipose-derived cells-based therapy." Arterioscler Thromb Vasc Biol **29**(7): 1093-9.
- Case, J., L. E. Mead, et al. (2007). "Human CD34+AC133+VEGFR-2+ cells are not endothelial progenitor cells but distinct, primitive hematopoietic progenitors." Exp Hematol **35**(7): 1109-18.
- Celermajer, D. S., K. E. Sorensen, et al. (1994). "Endothelium-dependent dilation in the systemic arteries of asymptomatic subjects relates to coronary risk factors and their interaction." J Am Coll Cardiol **24**(6): 1468-74.
- Celermajer, D. S., K. E. Sorensen, et al. (1992). "Non-invasive detection of endothelial dysfunction in children and adults at risk of atherosclerosis." Lancet **340**(8828): 1111-5.
- Celermajer, D. S., K. E. Sorensen, et al. (1994). "Aging is associated with endothelial dysfunction in healthy men years before the age-related decline in women." J Am Coll Cardiol **24**(2): 471-6.
- Ceradini, D. J., A. R. Kulkarni, et al. (2004). "Progenitor cell trafficking is regulated by hypoxic gradients through HIF-1 induction of SDF-1." Nat Med **10**(8): 858-64.
- Chan, C. T., S. H. Li, et al. (2005). "Nocturnal hemodialysis is associated with restoration of impaired endothelial progenitor cell biology in end-stage renal disease." Am J Physiol Renal Physiol **289**(4): F679-84.

- Chang, E. I., S. A. Loh, et al. (2007). "Age decreases endothelial progenitor cell recruitment through decreases in hypoxia-inducible factor 1alpha stabilization during ischemia." Circulation **116**(24): 2818-29.
- Chauhan, A., R. S. More, et al. (1996). "Aging-associated endothelial dysfunction in humans is reversed by L-arginine." J Am Coll Cardiol **28**(7): 1796-804.
- Chavakis, E., A. Aicher, et al. (2005). "Role of beta2-integrins for homing and neovascularization capacity of endothelial progenitor cells." J Exp Med **201**(1): 63-72.
- Chen, J. Z., F. R. Zhang, et al. (2004). "Number and activity of endothelial progenitor cells from peripheral blood in patients with hypercholesterolaemia." Clin Sci (Lond) **107**(3): 273-80.
- Chi, J. T., H. Y. Chang, et al. (2003). "Endothelial cell diversity revealed by global expression profiling." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(19): 10623-8.
- Chong, A. Y., A. D. Blann, et al. (2004). "Endothelial dysfunction and damage in congestive heart failure: relation of flow-mediated dilation to circulating endothelial cells, plasma indexes of endothelial damage, and brain natriuretic peptide." Circulation **110**(13): 1794-8.
- Cines, D. B., E. S. Pollak, et al. (1998). "Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders." Blood **91**(10): 3527-61.
- Clancy, R., G. Marder, et al. (2001). "Circulating activated endothelial cells in systemic lupus erythematosus: further evidence for diffuse vasculopathy." Arthritis Rheum **44**(5): 1203-8.
- Cobellis, G., A. Silvestroni, et al. (2008). "Long-term effects of repeated autologous transplantation of bone marrow cells in patients affected by peripheral arterial disease." Bone Marrow Transplant **42**(10): 667-72.
- Combes, V., A. C. Simon, et al. (1999). "In vitro generation of endothelial microparticles and possible prothrombotic activity in patients with lupus anticoagulant." J Clin Invest **104**(1): 93-102.
- Constans, J. and C. Conri (2006). "Circulating markers of endothelial function in cardiovascular disease." Clin Chim Acta **368**(1-2): 33-47.
- Cool, C. D., D. Kennedy, et al. (1997). "Pathogenesis and evolution of plexiform lesions in pulmonary hypertension associated with scleroderma and human immunodeficiency virus infection." Hum Pathol **28**(4): 434-42.
- Cool, C. D., J. S. Stewart, et al. (1999). "Three-dimensional reconstruction of pulmonary arteries in plexiform pulmonary hypertension using cell-specific markers. Evidence for a dynamic and heterogeneous process of pulmonary endothelial cell growth." Am J Pathol **155**(2): 411-9.
- Corretti, M. C., T. J. Anderson, et al. (2002). "Guidelines for the ultrasound assessment of endothelial-dependent flow-mediated vasodilation of the brachial artery: a report of the International Brachial Artery Reactivity Task Force." J Am Coll Cardiol **39**(2): 257-65.
- Crosby, J. R., W. E. Kaminski, et al. (2000). "Endothelial cells of hematopoietic origin make a significant contribution to adult blood vessel formation." Circ Res **87**(9): 728-30.
- Cruz-Gonzalez, I., P. Pabon, et al. (2008). "Identification of serum endoglin as a novel prognostic marker after acute myocardial infarction." J Cell Mol Med **12**(3): 955-61.

- Davie, N. J., J. T. Crossno, Jr., et al. (2004). "Hypoxia-induced pulmonary artery adventitial remodeling and neovascularization: contribution of progenitor cells." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **286**(4): L668-78.
- Davis, G. E. and D. R. Senger (2005). "Endothelial extracellular matrix: biosynthesis, remodeling, and functions during vascular morphogenesis and neovessel stabilization." Circ Res **97**(11): 1093-107.
- de Groot, K., F. H. Bahlmann, et al. (2005). "Kidney graft function determines endothelial progenitor cell number in renal transplant recipients." Transplantation **79**(8): 941-5.
- de Nigris, F., M. L. Balestrieri, et al. (2007). "Therapeutic effects of autologous bone marrow cells and metabolic intervention in the ischemic hindlimb of spontaneously hypertensive rats involve reduced cell senescence and CXCR4/Akt/eNOS pathways." J Cardiovasc Pharmacol **50**(4): 424-33.
- De Vriese, A. S., J. Billiet, et al. (2008). "Autologous transplantation of bone marrow mononuclear cells for limb ischemia in a caucasian population with atherosclerosis obliterans." J Intern Med **263**(4): 395-403.
- Deanfield, J., A. Donald, et al. (2005). "Endothelial function and dysfunction. Part I: Methodological issues for assessment in the different vascular beds: a statement by the Working Group on Endothelin and Endothelial Factors of the European Society of Hypertension." J Hypertens **23**(1): 7-17.
- Dejana, E., M. Corada, et al. (1995). "Endothelial cell-to-cell junctions." Faseb J **9**(10): 910-8.
- Del Papa, N., G. Colombo, et al. (2004). "Circulating endothelial cells as a marker of ongoing vascular disease in systemic sclerosis." Arthritis Rheum **50**(4): 1296-304.
- Delorme, B., A. Basire, et al. (2005). "Presence of endothelial progenitor cells, distinct from mature endothelial cells, within human CD146+ blood cells." Thromb Haemost **94**(6): 1270-9.
- Desai, A., A. Glaser, et al. (2009). "Microarray-based characterization of a colony assay used to investigate endothelial progenitor cells and relevance to endothelial function in humans." Arterioscler Thromb Vasc Biol **29**(1): 121-7.
- Deschaseaux, F., Z. Selmani, et al. (2007). "Two types of circulating endothelial progenitor cells in patients receiving long term therapy by HMG-CoA reductase inhibitors." Eur J Pharmacol **562**(1-2): 111-8.
- Devin, J. K. and P. P. Young (2008). "The effects of growth hormone and insulin-like growth factor-1 on the aging cardiovascular system and its progenitor cells." Curr Opin Investig Drugs **9**(9): 983-92.
- Di Stefano, R., M. C. Barsotti, et al. (2008). "The prostacyclin analogue iloprost increases circulating endothelial progenitor cells in patients with critical limb ischemia." Thromb Haemost **100**(5): 871-7.
- Dib, N., J. Dinsmore, et al. (2009). "One-year follow-up of feasibility and safety of the first U.S., randomized, controlled study using 3-dimensional guided catheter-based delivery of autologous skeletal myoblasts for ischemic cardiomyopathy (CAuSMIC study)." JACC Cardiovasc Interv **2**(1): 9-16.
- Dignat-George, F. and C. M. Boulanger (2011). "The many faces of endothelial microparticles." Arterioscler Thromb Vasc Biol **31**(1): 27-33.

- Dignat-George, F., F. Sabatier, et al. (2007). "Detection of circulating endothelial cells: CD146-based magnetic separation enrichment or flow cytometric assay?" J Clin Oncol **25**(5): e1-2; author reply e3-5.
- Diller, G. P., S. van Eijl, et al. (2008). "Circulating endothelial progenitor cells in patients with Eisenmenger syndrome and idiopathic pulmonary arterial hypertension." Circulation **117**(23): 3020-30.
- Dimmeler, S., A. Aicher, et al. (2001). "HMG-CoA reductase inhibitors (statins) increase endothelial progenitor cells via the PI 3-kinase/Akt pathway." J Clin Invest **108**(3): 391-7.
- Dimmeler, S. and A. M. Zeiher (2004). "Vascular repair by circulating endothelial progenitor cells: the missing link in atherosclerosis?" J Mol Med (Berl) **82**(10): 671-7.
- Du, L., C. C. Sullivan, et al. (2003). "Signaling molecules in nonfamilial pulmonary hypertension." N Engl J Med **348**(6): 500-9.
- Duda, D. G., K. S. Cohen, et al. (2006). "Differential CD146 expression on circulating versus tissue endothelial cells in rectal cancer patients: implications for circulating endothelial and progenitor cells as biomarkers for antiangiogenic therapy." J Clin Oncol **24**(9): 1449-53.
- Duda, D. G., K. S. Cohen, et al. (2007). "A protocol for phenotypic detection and enumeration of circulating endothelial cells and circulating progenitor cells in human blood." Nat Protoc **2**(4): 805-10.
- Duong Van Huyen, J. P., D. M. Smadja, et al. (2008). "Bone marrow-derived mononuclear cell therapy induces distal angiogenesis after local injection in critical leg ischemia." Mod Pathol **21**(7): 837-46.
- Durdu, S., A. R. Akar, et al. (2006). "Autologous bone-marrow mononuclear cell implantation for patients with Rutherford grade II-III thromboangiitis obliterans." J Vasc Surg **44**(4): 732-9.
- Eddahibi, S., M. Humbert, et al. (2000). "Imbalance between platelet vascular endothelial growth factor and platelet-derived growth factor in pulmonary hypertension. Effect of prostacyclin therapy." Am J Respir Crit Care Med **162**(4 Pt 1): 1493-9.
- Edelberg, J. M., L. Tang, et al. (2002). "Young adult bone marrow-derived endothelial precursor cells restore aging-impaired cardiac angiogenic function." Circ Res **90**(10): E89-93.
- Egashira, K., T. Inou, et al. (1993). "Effects of age on endothelium-dependent vasodilation of resistance coronary artery by acetylcholine in humans." Circulation **88**(1): 77-81.
- Elshal, M. F., S. S. Khan, et al. (2005). "CD146 (Mel-CAM), an adhesion marker of endothelial cells, is a novel marker of lymphocyte subset activation in normal peripheral blood." Blood **106**(8): 2923-4.
- Erdbruegger, U., M. Haubitz, et al. (2006). "Circulating endothelial cells: a novel marker of endothelial damage." Clin Chim Acta **373**(1-2): 17-26.
- Esato, K., K. Hamano, et al. (2002). "Neovascularization induced by autologous bone marrow cell implantation in peripheral arterial disease." Cell Transplant **11**(8): 747-52.
- Esposito, K., M. Ciotola, et al. (2006). "Endothelial microparticles correlate with endothelial dysfunction in obese women." J Clin Endocrinol Metab **91**(9): 3676-9.



- Estes, M. L., J. A. Mund, et al. (2010). "Identification of endothelial cells and progenitor cell subsets in human peripheral blood." Curr Protoc Cytom **Chapter 9**: Unit 9 33 1-11.
- Estes, M. L., J. A. Mund, et al. (2010). "Application of polychromatic flow cytometry to identify novel subsets of circulating cells with angiogenic potential." Cytometry A **77**(9): 831-9.
- Fadini, G. P., C. Agostini, et al. (2010). "Autologous stem cell therapy for peripheral arterial disease meta-analysis and systematic review of the literature." Atherosclerosis **209**(1): 10-7.
- Fadini, G. P., C. Agostini, et al. (2009). "Mechanisms and significance of progenitor cell reduction in the metabolic syndrome." Metab Syndr Relat Disord **7**(1): 5-10.
- Fadini, G. P., S. de Kreutzenberg, et al. (2008). "Gender differences in endothelial progenitor cells and cardiovascular risk profile: the role of female estrogens." Arterioscler Thromb Vasc Biol **28**(5): 997-1004.
- Fadini, G. P., M. Miorin, et al. (2005). "Circulating endothelial progenitor cells are reduced in peripheral vascular complications of type 2 diabetes mellitus." J Am Coll Cardiol **45**(9): 1449-57.
- Fadini, G. P., M. Schiavon, et al. (2007). "Depletion of endothelial progenitor cells may link pulmonary fibrosis and pulmonary hypertension." Am J Respir Crit Care Med **176**(7): 724-5; author reply 725.
- Feng, B., Y. Chen, et al. (2010). "Circulating level of microparticles and their correlation with arterial elasticity and endothelium-dependent dilation in patients with type 2 diabetes mellitus." Atherosclerosis **208**(1): 264-9.
- Fleg, J. L., F. O'Connor, et al. (1995). "Impact of age on the cardiovascular response to dynamic upright exercise in healthy men and women." J Appl Physiol **78**(3): 890-900.
- Fonsatti, E. and M. Maio (2004). "Highlights on endoglin (CD105): from basic findings towards clinical applications in human cancer." J Transl Med **2**(1): 18.
- Foubert, P., J. S. Silvestre, et al. (2007). "PSGL-1-mediated activation of EphB4 increases the proangiogenic potential of endothelial progenitor cells." J Clin Invest **117**(6): 1527-37.
- Franz, R. W., A. Parks, et al. (2009). "Use of autologous bone marrow mononuclear cell implantation therapy as a limb salvage procedure in patients with severe peripheral arterial disease." J Vasc Surg **50**(6): 1378-90.
- Furstenberger, G., R. von Moos, et al. (2005). "Real-time PCR of CD146 mRNA in peripheral blood enables the relative quantification of circulating endothelial cells and is an indicator of angiogenesis." Br J Cancer **93**(7): 793-8.
- Fuster, V., L. Badimon, et al. (1992). "The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndromes (1)." N Engl J Med **326**(4): 242-50.
- Galie, N., M. M. Hoeper, et al. (2009). "Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension." Eur Respir J **34**(6): 1219-63.
- Galie, N., A. Manes, et al. (2003). "Prostanoids for pulmonary arterial hypertension." Am J Respir Med **2**(2): 123-37.
- Garcia-Porrero, J. A., A. Manaia, et al. (1998). "Antigenic profiles of endothelial and hemopoietic lineages in murine intraembryonic hemogenic sites." Dev Comp Immunol **22**(3): 303-19.

- Gates, P. E., M. L. Boucher, et al. (2007). "Impaired flow-mediated dilation with age is not explained by L-arginine bioavailability or endothelial asymmetric dimethylarginine protein expression." J Appl Physiol **102**(1): 63-71.
- Gehling, U. M., S. Ergun, et al. (2000). "In vitro differentiation of endothelial cells from AC133-positive progenitor cells." Blood **95**(10): 3106-12.
- George, F., C. Brisson, et al. (1992). "Rapid isolation of human endothelial cells from whole blood using S-Endo1 monoclonal antibody coupled to immuno-magnetic beads: demonstration of endothelial injury after angioplasty." Thromb Haemost **67**(1): 147-53.
- George, F., P. Brouqui, et al. (1993). "Demonstration of Rickettsia conorii-induced endothelial injury in vivo by measuring circulating endothelial cells, thrombomodulin, and von Willebrand factor in patients with Mediterranean spotted fever." Blood **82**(7): 2109-16.
- George, F., P. Poncelet, et al. (1991). "Cytofluorometric detection of human endothelial cells in whole blood using S-Endo 1 monoclonal antibody." J Immunol Methods **139**(1): 65-75.
- George, J., E. Goldstein, et al. (2004). "Circulating endothelial progenitor cells in patients with unstable angina: association with systemic inflammation." Eur Heart J **25**(12): 1003-8.
- George, J., I. Herz, et al. (2003). "Number and adhesive properties of circulating endothelial progenitor cells in patients with in-stent restenosis." Arterioscler Thromb Vasc Biol **23**(12): e57-60.
- Gerhard, M., M. A. Roddy, et al. (1996). "Aging progressively impairs endothelium-dependent vasodilation in forearm resistance vessels of humans." Hypertension **27**(4): 849-53.
- Giaid, A. and D. Saleh (1995). "Reduced expression of endothelial nitric oxide synthase in the lungs of patients with pulmonary hypertension." N Engl J Med **333**(4): 214-21.
- Gill, M., S. Dias, et al. (2001). "Vascular trauma induces rapid but transient mobilization of VEGFR2(+)AC133(+) endothelial precursor cells." Circ Res **88**(2): 167-74.
- Gokce, N., J. F. Keaney, Jr., et al. (2002). "Risk stratification for postoperative cardiovascular events via noninvasive assessment of endothelial function: a prospective study." Circulation **105**(13): 1567-72.
- Goon, P. K., C. J. Boos, et al. (2006). "Detection and quantification of mature circulating endothelial cells using flow cytometry and immunomagnetic beads: a methodological comparison." Thromb Haemost **96**(1): 45-52.
- Grant, M. B., W. S. May, et al. (2002). "Adult hematopoietic stem cells provide functional hemangioblast activity during retinal neovascularization." Nat Med **8**(6): 607-12.
- Grisar, J., D. Aletaha, et al. (2005). "Depletion of endothelial progenitor cells in the peripheral blood of patients with rheumatoid arthritis." Circulation **111**(2): 204-11.
- Grosjean, J., S. Kiriakidis, et al. (2006). "Vascular endothelial growth factor signalling in endothelial cell survival: a role for NFkappaB." Biochem Biophys Res Commun **340**(3): 984-94.
- Gu, Y. Q., J. Zhang, et al. (2008). "Transplantation of autologous bone marrow mononuclear cells for patients with lower limb ischemia." Chin Med J (Engl) **121**(11): 963-7.

- Gulati, R., D. Jevremovic, et al. (2003). "Diverse origin and function of cells with endothelial phenotype obtained from adult human blood." Circ Res **93**(11): 1023-5.
- Gunsilius, E., H. C. Duba, et al. (2000). "Evidence from a leukaemia model for maintenance of vascular endothelium by bone-marrow-derived endothelial cells." Lancet **355**(9216): 1688-91.
- Gupta, R., J. Tongers, et al. (2009). "Human studies of angiogenic gene therapy." Circ Res **105**(8): 724-36.
- Guyen, H., R. M. Shepherd, et al. (2006). "The number of endothelial progenitor cell colonies in the blood is increased in patients with angiographically significant coronary artery disease." J Am Coll Cardiol **48**(8): 1579-87.
- Gyongyosi, M., I. Lang, et al. (2009). "Combined delivery approach of bone marrow mononuclear stem cells early and late after myocardial infarction: the MYSTAR prospective, randomized study." Nat Clin Pract Cardiovasc Med **6**(1): 70-81.
- Harhour, K., A. Kebir, et al. (2010). "Soluble CD146 displays angiogenic properties and promotes neovascularization in experimental hind-limb ischemia." Blood **115**(18): 3843-51.
- Harris, R. A., S. K. Nishiyama, et al. (2010). "Ultrasound assessment of flow-mediated dilation." Hypertension **55**(5): 1075-85.
- Hattori, K., S. Dias, et al. (2001). "Vascular endothelial growth factor and angiopoietin-1 stimulate postnatal hematopoiesis by recruitment of vasculogenic and hematopoietic stem cells." J Exp Med **193**(9): 1005-14.
- Hayashida, K., J. Fujita, et al. (2005). "Bone marrow-derived cells contribute to pulmonary vascular remodeling in hypoxia-induced pulmonary hypertension." Chest **127**(5): 1793-8.
- He, T., M. J. Joyner, et al. (2009). "Aging decreases expression and activity of glutathione peroxidase-1 in human endothelial progenitor cells." Microvasc Res **78**(3): 447-52.
- He, T., T. Lu, et al. (2008). "Angiogenic function of prostacyclin biosynthesis in human endothelial progenitor cells." Circ Res **103**(1): 80-8.
- Heeschen, C., A. Aicher, et al. (2003). "Erythropoietin is a potent physiologic stimulus for endothelial progenitor cell mobilization." Blood **102**(4): 1340-6.
- Heiss, C., S. Keymel, et al. (2005). "Impaired progenitor cell activity in age-related endothelial dysfunction." J Am Coll Cardiol **45**(9): 1441-8.
- Heissig, B., K. Hattori, et al. (2002). "Recruitment of stem and progenitor cells from the bone marrow niche requires MMP-9 mediated release of kit-ligand." Cell **109**(5): 625-37.
- Hendrikx, M., K. Hensen, et al. (2006). "Recovery of regional but not global contractile function by the direct intramyocardial autologous bone marrow transplantation: results from a randomized controlled clinical trial." Circulation **114**(1 Suppl): I101-7.
- Hershman, D., A. I. Neugut, et al. (2007). "Acute myeloid leukemia or myelodysplastic syndrome following use of granulocyte colony-stimulating factors during breast cancer adjuvant chemotherapy." J Natl Cancer Inst **99**(3): 196-205.
- Higashi, Y., M. Kimura, et al. (2004). "Autologous bone-marrow mononuclear cell implantation improves endothelium-dependent vasodilation in patients with limb ischemia." Circulation **109**(10): 1215-8.

- Hill, J. M., G. Zalos, et al. (2003). "Circulating endothelial progenitor cells, vascular function, and cardiovascular risk." N Engl J Med **348**(7): 593-600.
- Hladovec, J. (1978). "Circulating endothelial cells as a sign of vessel wall lesions." Physiol Bohemoslov **27**(2): 140-4.
- Hoetzer, G. L., G. P. Van Guilder, et al. (2007). "Aging, exercise, and endothelial progenitor cell clonogenic and migratory capacity in men." J Appl Physiol **102**(3): 847-52.
- Hopkins, N. and P. McLoughlin (2002). "The structural basis of pulmonary hypertension in chronic lung disease: remodelling, rarefaction or angiogenesis?" J Anat **201**(4): 335-48.
- Horie, T., R. Onodera, et al. (2010). "Long-term clinical outcomes for patients with lower limb ischemia implanted with G-CSF-mobilized autologous peripheral blood mononuclear cells." Atherosclerosis **208**(2): 461-6.
- Hristov, M., S. Schmitz, et al. (2012). "A flow cytometric protocol for enumeration of endothelial progenitor cells and monocyte subsets in human blood." J Immunol Methods **381**(1-2): 9-13.
- Huang, P., S. Li, et al. (2005). "Autologous transplantation of granulocyte colony-stimulating factor-mobilized peripheral blood mononuclear cells improves critical limb ischemia in diabetes." Diabetes Care **28**(9): 2155-60.
- Huikuri, H. V., K. Kervinen, et al. (2008). "Effects of intracoronary injection of mononuclear bone marrow cells on left ventricular function, arrhythmia risk profile, and restenosis after thrombolytic therapy of acute myocardial infarction." Eur Heart J **29**(22): 2723-32.
- Humbert, M., D. Montani, et al. (2008). "Endothelial cell dysfunction and cross talk between endothelium and smooth muscle cells in pulmonary arterial hypertension." Vascul Pharmacol **49**(4-6): 113-8.
- Humbert, M., G. Monti, et al. (1995). "Increased interleukin-1 and interleukin-6 serum concentrations in severe primary pulmonary hypertension." Am J Respir Crit Care Med **151**(5): 1628-31.
- Humbert, M., N. W. Morrell, et al. (2004). "Cellular and molecular pathobiology of pulmonary arterial hypertension." J Am Coll Cardiol **43**(12 Suppl S): 13S-24S.
- Hur, J., H. M. Yang, et al. (2007). "Identification of a novel role of T cells in postnatal vasculogenesis: characterization of endothelial progenitor cell colonies." Circulation **116**(15): 1671-82.
- Hur, J., C. H. Yoon, et al. (2004). "Characterization of two types of endothelial progenitor cells and their different contributions to neovasculation." Arterioscler Thromb Vasc Biol **24**(2): 288-93.
- Idei, N., J. Soga, et al. (2011). "Autologous bone-marrow mononuclear cell implantation reduces long-term major amputation risk in patients with critical limb ischemia: a comparison of atherosclerotic peripheral arterial disease and Buerger disease." Circ Cardiovasc Interv **4**(1): 15-25.
- Iglarz, M., J. S. Silvestre, et al. (2001). "Chronic blockade of endothelin receptors improves ischemia-induced angiogenesis in rat hindlimbs through activation of vascular endothelial growth factor- $\alpha$  pathway." Arterioscler Thromb Vasc Biol **21**(10): 1598-603.

- Igreja, C., M. Courinha, et al. (2007). "Characterization and clinical relevance of circulating and biopsy-derived endothelial progenitor cells in lymphoma patients." Haematologica **92**(4): 469-77.
- Ii, M., H. Takenaka, et al. (2006). "Endothelial progenitor thrombospondin-1 mediates diabetes-induced delay in reendothelialization following arterial injury." Circ Res **98**(5): 697-704.
- Ikemoto, T., Y. Hojo, et al. (2012). "Plasma endoglin as a marker to predict cardiovascular events in patients with chronic coronary artery diseases." Heart Vessels **27**(4): 344-51.
- Imanishi, T., T. Hano, et al. (2003). "Oxidized low-density lipoprotein inhibits vascular endothelial growth factor-induced endothelial progenitor cell differentiation." Clin Exp Pharmacol Physiol **30**(9): 665-70.
- Imanishi, T., T. Hano, et al. (2004). "Oxidized low-density lipoprotein induces endothelial progenitor cell senescence, leading to cellular dysfunction." Clin Exp Pharmacol Physiol **31**(7): 407-13.
- Ingram, D. A., N. M. Caplice, et al. (2005). "Unresolved questions, changing definitions, and novel paradigms for defining endothelial progenitor cells." Blood **106**(5): 1525-31.
- Ingram, D. A., L. E. Mead, et al. (2005). "Vessel wall-derived endothelial cells rapidly proliferate because they contain a complete hierarchy of endothelial progenitor cells." Blood **105**(7): 2783-6.
- Ingram, D. A., L. E. Mead, et al. (2004). "Identification of a novel hierarchy of endothelial progenitor cells using human peripheral and umbilical cord blood." Blood **104**(9): 2752-60.
- Ishida, A., Y. Ohya, et al. (2005). "Autologous peripheral blood mononuclear cell implantation for patients with peripheral arterial disease improves limb ischemia." Circ J **69**(10): 1260-5.
- Italiano, J. E., Jr. and E. M. Battinelli (2009). "Selective sorting of alpha-granule proteins." J Thromb Haemost **7 Suppl 1**: 173-6.
- Ivy, D. (2012). "Advances in pediatric pulmonary arterial hypertension." Curr Opin Cardiol **27**(2): 70-81.
- Iwaguro, H., J. Yamaguchi, et al. (2002). "Endothelial progenitor cell vascular endothelial growth factor gene transfer for vascular regeneration." Circulation **105**(6): 732-8.
- Iwasaki, H., A. Kawamoto, et al. (2006). "Dose-dependent contribution of CD34-positive cell transplantation to concurrent vasculogenesis and cardiomyogenesis for functional regenerative recovery after myocardial infarction." Circulation **113**(10): 1311-25.
- Izikki, M., C. Guignabert, et al. (2009). "Endothelial-derived FGF2 contributes to the progression of pulmonary hypertension in humans and rodents." J Clin Invest **119**(3): 512-23.
- Jackson, K. A., S. M. Majka, et al. (2001). "Regeneration of ischemic cardiac muscle and vascular endothelium by adult stem cells." J Clin Invest **107**(11): 1395-402.
- Jacques, N., N. Vimond, et al. (2008). "Quantification of circulating mature endothelial cells using a whole blood four-color flow cytometric assay." J Immunol Methods **337**(2): 132-43.

- Jais, X., P. Darteville, et al. (2007). "[Postembolic pulmonary hypertension]." Rev Mal Respir **24**(4 Pt 1): 497-508.
- Jiang, S., L. Walker, et al. (2004). "Transplanted human bone marrow contributes to vascular endothelium." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(48): 16891-6.
- Jie, K. E., M. A. Zaikova, et al. (2010). "Progenitor cells and vascular function are impaired in patients with chronic kidney disease." Nephrol Dial Transplant **25**(6): 1875-82.
- Jimenez, J. J., W. Jy, et al. (2001). "Elevated endothelial microparticles in thrombotic thrombocytopenic purpura: findings from brain and renal microvascular cell culture and patients with active disease." Br J Haematol **112**(1): 81-90.
- Jimenez, J. J., W. Jy, et al. (2003). "Endothelial cells release phenotypically and quantitatively distinct microparticles in activation and apoptosis." Thromb Res **109**(4): 175-80.
- Joannides, R., W. E. Haefeli, et al. (1995). "Nitric oxide is responsible for flow-dependent dilatation of human peripheral conduit arteries in vivo." Circulation **91**(5): 1314-9.
- Jujo, K., H. Hamada, et al. (2010). "CXCR4 blockade augments bone marrow progenitor cell recruitment to the neovasculature and reduces mortality after myocardial infarction." Proc Natl Acad Sci U S A **107**(24): 11008-13.
- Jung, C., A. Rafnsson, et al. (2010). "Different subpopulations of endothelial progenitor cells and circulating apoptotic progenitor cells in patients with vascular disease and diabetes." Int J Cardiol **143**(3): 368-72.
- Junhui, Z., W. Xingxiang, et al. (2008). "Reduced number and activity of circulating endothelial progenitor cells in patients with idiopathic pulmonary arterial hypertension." Respir Med **102**(7): 1073-9.
- Juonala, M., J. S. Viikari, et al. (2004). "Interrelations between brachial endothelial function and carotid intima-media thickness in young adults: the cardiovascular risk in young Finns study." Circulation **110**(18): 2918-23.
- Jy, W., L. L. Horstman, et al. (2004). "Measuring circulating cell-derived microparticles." J Thromb Haemost **2**(10): 1842-51.
- Kajiguchi, M., T. Kondo, et al. (2007). "Safety and efficacy of autologous progenitor cell transplantation for therapeutic angiogenesis in patients with critical limb ischemia." Circ J **71**(2): 196-201.
- Kalka, C., H. Masuda, et al. (2000). "Vascular endothelial growth factor(165) gene transfer augments circulating endothelial progenitor cells in human subjects." Circ Res **86**(12): 1198-202.
- Kalka, C., H. Masuda, et al. (2000). "Transplantation of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(7): 3422-7.
- Kalka, C., H. Tehrani, et al. (2000). "VEGF gene transfer mobilizes endothelial progenitor cells in patients with inoperable coronary disease." Ann Thorac Surg **70**(3): 829-34.
- Kang, H. J., H. S. Kim, et al. (2004). "Effects of intracoronary infusion of peripheral blood stem-cells mobilised with granulocyte-colony stimulating factor on left ventricular systolic function and restenosis after coronary stenting in myocardial infarction: the MAGIC cell randomised clinical trial." Lancet **363**(9411): 751-6.

- Kang, Y., F. Wang, et al. (2006). "Knockdown of CD146 reduces the migration and proliferation of human endothelial cells." Cell Res **16**(3): 313-8.
- Kaplan, R. N., R. D. Riba, et al. (2005). "VEGFR1-positive haematopoietic bone marrow progenitors initiate the pre-metastatic niche." Nature **438**(7069): 820-7.
- Kappei, D. and J. A. Londono-Vallejo (2008). "Telomere length inheritance and aging." Mech Ageing Dev **129**(1-2): 17-26.
- Karavidas, A., G. Lazaros, et al. (2010). "Aging and the cardiovascular system." Hellenic J Cardiol **51**(5): 421-7.
- Kawamoto, A., H. C. Gwon, et al. (2001). "Therapeutic potential of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for myocardial ischemia." Circulation **103**(5): 634-7.
- Kawamoto, A., M. Katayama, et al. (2009). "Intramuscular transplantation of G-CSF-mobilized CD34(+) cells in patients with critical limb ischemia: a phase I/IIa, multicenter, single-blinded, dose-escalation clinical trial." Stem Cells **27**(11): 2857-64.
- Kawamura, A., T. Horie, et al. (2005). "Prevention of limb amputation in patients with limbs ulcers by autologous peripheral blood mononuclear cell implantation." Ther Apher Dial **9**(1): 59-63.
- Khan, S. S., M. A. Solomon, et al. (2005). "Detection of circulating endothelial cells and endothelial progenitor cells by flow cytometry." Cytometry B Clin Cytom **64**(1): 1-8.
- Kim, S. W., H. Han, et al. (2006). "Successful stem cell therapy using umbilical cord blood-derived multipotent stem cells for Buerger's disease and ischemic limb disease animal model." Stem Cells **24**(6): 1620-6.
- Kocher, A. A., M. D. Schuster, et al. (2001). "Neovascularization of ischemic myocardium by human bone-marrow-derived angioblasts prevents cardiomyocyte apoptosis, reduces remodeling and improves cardiac function." Nat Med **7**(4): 430-6.
- Koga, H., S. Sugiyama, et al. (2005). "Elevated levels of VE-cadherin-positive endothelial microparticles in patients with type 2 diabetes mellitus and coronary artery disease." J Am Coll Cardiol **45**(10): 1622-30.
- Kondo, T., M. Hayashi, et al. (2004). "Smoking cessation rapidly increases circulating progenitor cells in peripheral blood in chronic smokers." Arterioscler Thromb Vasc Biol **24**(8): 1442-7.
- Kovacic, J. C., P. Macdonald, et al. (2008). "Safety and efficacy of consecutive cycles of granulocyte-colony stimulating factor, and an intracoronary CD133+ cell infusion in patients with chronic refractory ischemic heart disease: the G-CSF in angina patients with IHD to stimulate neovascularization (GAIN I) trial." Am Heart J **156**(5): 954-63.
- Krankel, N., V. Adams, et al. (2005). "Hyperglycemia reduces survival and impairs function of circulating blood-derived progenitor cells." Arterioscler Thromb Vasc Biol **25**(4): 698-703.
- Kudo, F. A., T. Nishibe, et al. (2003). "Autologous transplantation of peripheral blood endothelial progenitor cells (CD34+) for therapeutic angiogenesis in patients with critical limb ischemia." Int Angiol **22**(4): 344-8.
- Kushner, E. J., G. P. Van Gelder, et al. (2009). "Aging and endothelial progenitor cell telomere length in healthy men." Clin Chem Lab Med **47**(1): 47-50.

- Lacroix, R., L. Plawinski, et al. (2012). "Leukocyte- and endothelial-derived microparticles: a circulating source for fibrinolysis." Haematologica.
- Lahtenvuo, J. and A. Rosenzweig (2012). "Effects of aging on angiogenesis." Circ Res **110**(9): 1252-64.
- Lakatta, E. G. (2003). "Arterial and cardiac aging: major shareholders in cardiovascular disease enterprises: Part III: cellular and molecular clues to heart and arterial aging." Circulation **107**(3): 490-7.
- Lakatta, E. G. and D. Levy (2003). "Arterial and cardiac aging: major shareholders in cardiovascular disease enterprises: Part I: aging arteries: a "set up" for vascular disease." Circulation **107**(1): 139-46.
- Lamallice, L., F. Le Boeuf, et al. (2007). "Endothelial cell migration during angiogenesis." Circ Res **100**(6): 782-94.
- Lampugnani, M. G. and E. Dejana (1997). "Interendothelial junctions: structure, signalling and functional roles." Curr Opin Cell Biol **9**(5): 674-82.
- Lancrin, C., P. Sroczynska, et al. (2009). "The haemangioblast generates haematopoietic cells through a haemogenic endothelium stage." Nature **457**(7231): 892-5.
- Landmesser, U., N. Engberding, et al. (2004). "Statin-induced improvement of endothelial progenitor cell mobilization, myocardial neovascularization, left ventricular function, and survival after experimental myocardial infarction requires endothelial nitric oxide synthase." Circulation **110**(14): 1933-9.
- Lane, K. B., R. D. Machado, et al. (2000). "Heterozygous germline mutations in BMPR2, encoding a TGF-beta receptor, cause familial primary pulmonary hypertension." Nat Genet **26**(1): 81-4.
- Lapidos, K. A., S. M. Sprague, et al. (2012). "Impact of serum source and inflammatory cytokines on the isolation of endothelial colony-forming cells from peripheral blood." J Tissue Eng Regen Med.
- Lasala, G. P., J. A. Silva, et al. (2010). "Combination stem cell therapy for the treatment of severe limb ischemia: safety and efficacy analysis." Angiology **61**(6): 551-6.
- Laufs, U., A. Urhausen, et al. (2005). "Running exercise of different duration and intensity: effect on endothelial progenitor cells in healthy subjects." Eur J Cardiovasc Prev Rehabil **12**(4): 407-14.
- Laufs, U., S. Wassmann, et al. (2005). "Physical inactivity increases oxidative stress, endothelial dysfunction, and atherosclerosis." Arterioscler Thromb Vasc Biol **25**(4): 809-14.
- Laufs, U., N. Werner, et al. (2004). "Physical training increases endothelial progenitor cells, inhibits neointima formation, and enhances angiogenesis." Circulation **109**(2): 220-6.
- Laurent, S., J. Cockcroft, et al. (2006). "Expert consensus document on arterial stiffness: methodological issues and clinical applications." Eur Heart J **27**(21): 2588-605.
- Lee, S. D., K. R. Shroyer, et al. (1998). "Monoclonal endothelial cell proliferation is present in primary but not secondary pulmonary hypertension." J Clin Invest **101**(5): 927-34.
- Leistner, D. M., U. Fischer-Rasokat, et al. (2011). "Transplantation of progenitor cells and regeneration enhancement in acute myocardial infarction (TOPCARE-AMI): final 5-year results suggest long-term safety and efficacy." Clin Res Cardiol **100**(10): 925-34.



- Lekakis, J., P. Abraham, et al. (2011). "Methods for evaluating endothelial function: a position statement from the European Society of Cardiology Working Group on Peripheral Circulation." Eur J Cardiovasc Prev Rehabil **18**(6): 775-89.
- Lenk, K., V. Adams, et al. (2005). "Therapeutical potential of blood-derived progenitor cells in patients with peripheral arterial occlusive disease and critical limb ischaemia." Eur Heart J **26**(18): 1903-9.
- Lev, E. I., N. S. Kleiman, et al. (2005). "Circulating endothelial progenitor cells and coronary collaterals in patients with non-ST segment elevation myocardial infarction." J Vasc Res **42**(5): 408-14.
- Levy, M., C. Maurey, et al. (2007). "Impaired apoptosis of pulmonary endothelial cells is associated with intimal proliferation and irreversibility of pulmonary hypertension in congenital heart disease." J Am Coll Cardiol **49**(7): 803-10.
- Li, B., E. E. Sharpe, et al. (2006). "VEGF and PlGF promote adult vasculogenesis by enhancing EPC recruitment and vessel formation at the site of tumor neovascularization." Faseb J **20**(9): 1495-7.
- Li, T. S., K. Cheng, et al. (2012). "Direct comparison of different stem cell types and subpopulations reveals superior paracrine potency and myocardial repair efficacy with cardiosphere-derived cells." J Am Coll Cardiol **59**(10): 942-53.
- Liles, W. C., H. E. Broxmeyer, et al. (2003). "Mobilization of hematopoietic progenitor cells in healthy volunteers by AMD3100, a CXCR4 antagonist." Blood **102**(8): 2728-30.
- Lin, R. Z., A. Dreyzin, et al. (2011). "Functional endothelial progenitor cells from cryopreserved umbilical cord blood." Cell Transplant **20**(4): 515-22.
- Lin, Y., D. J. Weisdorf, et al. (2000). "Origins of circulating endothelial cells and endothelial outgrowth from blood." J Clin Invest **105**(1): 71-7.
- London, G. M., J. Blacher, et al. (2001). "Arterial wave reflections and survival in end-stage renal failure." Hypertension **38**(3): 434-8.
- Loomans, C. J., E. J. de Koning, et al. (2004). "Endothelial progenitor cell dysfunction: a novel concept in the pathogenesis of vascular complications of type 1 diabetes." Diabetes **53**(1): 195-9.
- Lopes, A. A. and P. W. O'Leary (2009). "Measurement, interpretation and use of haemodynamic parameters in pulmonary hypertension associated with congenital cardiac disease." Cardiol Young **19**(5): 431-5.
- Lopez-Novoa, J. M. and C. Bernabeu (2010). "The physiological role of endoglin in the cardiovascular system." Am J Physiol Heart Circ Physiol **299**(4): H959-74.
- Losordo, D. W., T. D. Henry, et al. (2011). "Intramyocardial, autologous CD34+ cell therapy for refractory angina." Circ Res **109**(4): 428-36.
- Losordo, D. W., R. A. Schatz, et al. (2007). "Intramyocardial transplantation of autologous CD34+ stem cells for intractable angina: a phase I/IIa double-blind, randomized controlled trial." Circulation **115**(25): 3165-72.
- Lu, D., B. Chen, et al. (2011). "Comparison of bone marrow mesenchymal stem cells with bone marrow-derived mononuclear cells for treatment of diabetic critical limb ischemia and foot ulcer: a double-blind, randomized, controlled trial." Diabetes Res Clin Pract **92**(1): 26-36.

- Lunde, K., S. Solheim, et al. (2006). "Intracoronary injection of mononuclear bone marrow cells in acute myocardial infarction." *N Engl J Med* **355**(12): 1199-209.
- Lyden, D., K. Hattori, et al. (2001). "Impaired recruitment of bone-marrow-derived endothelial and hematopoietic precursor cells blocks tumor angiogenesis and growth." *Nat Med* **7**(11): 1194-201.
- Maeng, Y. S., H. J. Choi, et al. (2009). "Endothelial progenitor cell homing: prominent role of the IGF2-IGF2R-PLCbeta2 axis." *Blood* **113**(1): 233-43.
- Mahnke, Y. D. and M. Roederer (2007). "Optimizing a multicolor immunophenotyping assay." *Clin Lab Med* **27**(3): 469-85, v.
- Maisonpierre, P. C., C. Suri, et al. (1997). "Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts in vivo angiogenesis." *Science* **277**(5322): 55-60.
- Makin, A. J., A. D. Blann, et al. (2004). "Assessment of endothelial damage in atherosclerotic vascular disease by quantification of circulating endothelial cells. Relationship with von Willebrand factor and tissue factor." *Eur Heart J* **25**(5): 371-6.
- Makkar, R. R., R. R. Smith, et al. (2012). "Intracoronary cardiosphere-derived cells for heart regeneration after myocardial infarction (CADUCEUS): a prospective, randomised phase 1 trial." *Lancet* **379**(9819): 895-904.
- Mancuso, P., P. Antoniotti, et al. (2009). "Validation of a standardized method for enumerating circulating endothelial cells and progenitors: flow cytometry and molecular and ultrastructural analyses." *Clin Cancer Res* **15**(1): 267-73.
- Mancuso, P., A. Burlini, et al. (2001). "Resting and activated endothelial cells are increased in the peripheral blood of cancer patients." *Blood* **97**(11): 3658-61.
- Mancuso, P., M. Colleoni, et al. (2006). "Circulating endothelial-cell kinetics and viability predict survival in breast cancer patients receiving metronomic chemotherapy." *Blood* **108**(2): 452-9.
- Mancuso, P., C. Rabascio, et al. (2003). "Strategies to investigate circulating endothelial cells in cancer." *Pathophysiol Haemost Thromb* **33**(5-6): 503-6.
- Marsboom, G., P. Pokreisz, et al. (2008). "Sustained endothelial progenitor cell dysfunction after chronic hypoxia-induced pulmonary hypertension." *Stem Cells* **26**(4): 1017-26.
- Martin, B. J. and T. J. Anderson (2009). "Risk prediction in cardiovascular disease: the prognostic significance of endothelial dysfunction." *Can J Cardiol* **25** Suppl A: 15A-20A.
- Martin-Rendon, E., S. J. Brunskill, et al. (2008). "Autologous bone marrow stem cells to treat acute myocardial infarction: a systematic review." *Eur Heart J* **29**(15): 1807-18.
- Masouleh, B. K., A. Baraniskin, et al. (2010). "Quantification of circulating endothelial progenitor cells in human peripheral blood: establishing a reliable flow cytometry protocol." *J Immunol Methods* **357**(1-2): 38-42.
- Massa, M., R. Campanelli, et al. (2009). "Rapid and large increase of the frequency of circulating endothelial colony-forming cells (ECFCs) generating late outgrowth endothelial cells in patients with acute myocardial infarction." *Exp Hematol* **37**(1): 8-9.

- Massa, M., V. Rosti, et al. (2005). "Increased circulating hematopoietic and endothelial progenitor cells in the early phase of acute myocardial infarction." Blood **105**(1): 199-206.
- Massberg, S., I. Konrad, et al. (2006). "Platelets secrete stromal cell-derived factor 1alpha and recruit bone marrow-derived progenitor cells to arterial thrombi in vivo." J Exp Med **203**(5): 1221-33.
- Matoba, S., T. Tatsumi, et al. (2008). "Long-term clinical outcome after intramuscular implantation of bone marrow mononuclear cells (Therapeutic Angiogenesis by Cell Transplantation [TACT] trial) in patients with chronic limb ischemia." Am Heart J **156**(5): 1010-8.
- McFarland, D. C., C. Zhang, et al. (2006). "Confounding effects of platelets on flow cytometric analysis and cell-sorting experiments using blood-derived cells." Cytometry A **69**(2): 86-94.
- Menasche, P., O. Alfieri, et al. (2008). "The Myoblast Autologous Grafting in Ischemic Cardiomyopathy (MAGIC) trial: first randomized placebo-controlled study of myoblast transplantation." Circulation **117**(9): 1189-200.
- Meneveau, N., F. Deschaseaux, et al. (2011). "Presence of endothelial colony-forming cells is associated with reduced microvascular obstruction limiting infarct size and left ventricular remodelling in patients with acute myocardial infarction." Basic Res Cardiol **106**(6): 1397-410.
- Meyer, G. P., K. C. Wollert, et al. (2006). "Intracoronary bone marrow cell transfer after myocardial infarction: eighteen months' follow-up data from the randomized, controlled BOOST (BOne marrOW transfer to enhance ST-elevation infarct regeneration) trial." Circulation **113**(10): 1287-94.
- Michaud, S. E., S. Dussault, et al. (2006). "Circulating endothelial progenitor cells from healthy smokers exhibit impaired functional activities." Atherosclerosis **187**(2): 423-32.
- Milici, A. J., M. B. Furie, et al. (1985). "The formation of fenestrations and channels by capillary endothelium in vitro." Proc Natl Acad Sci U S A **82**(18): 6181-5.
- Min, T. Q., C. J. Zhu, et al. (2004). "Improvement in endothelial progenitor cells from peripheral blood by ramipril therapy in patients with stable coronary artery disease." Cardiovasc Drugs Ther **18**(3): 203-9.
- Minamino, T., H. Miyauchi, et al. (2004). "Vascular cell senescence and vascular aging." J Mol Cell Cardiol **36**(2): 175-83.
- Miyamoto, K., K. Nishigami, et al. (2006). "Unblinded pilot study of autologous transplantation of bone marrow mononuclear cells in patients with thromboangiitis obliterans." Circulation **114**(24): 2679-84.
- Mizuno, H., M. Miyamoto, et al. (2010). "Therapeutic angiogenesis by autologous bone marrow cell implantation together with allogeneic cultured dermal substitute for intractable ulcers in critical limb ischaemia." J Plast Reconstr Aesthet Surg **63**(11): 1875-82.
- Modena, M. G., L. Bonetti, et al. (2002). "Prognostic role of reversible endothelial dysfunction in hypertensive postmenopausal women." J Am Coll Cardiol **40**(3): 505-10.

- Montani, D., O. Sitbon, et al. (2005). "[Treatment of pulmonary arterial hypertension]." Presse Med **34**(19 Pt 2): 1445-55.
- Morel, O., F. Toti, et al. (2006). "Procoagulant microparticles: disrupting the vascular homeostasis equation?" Arterioscler Thromb Vasc Biol **26**(12): 2594-604.
- Morici, G., D. Zangla, et al. (2005). "Supramaximal exercise mobilizes hematopoietic progenitors and reticulocytes in athletes." Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol **289**(5): R1496-503.
- Morrell, N. W., S. Adnot, et al. (2009). "Cellular and molecular basis of pulmonary arterial hypertension." J Am Coll Cardiol **54**(1 Suppl): S20-31.
- Moser, K. M. and C. M. Bloor (1993). "Pulmonary vascular lesions occurring in patients with chronic major vessel thromboembolic pulmonary hypertension." Chest **103**(3): 685-92.
- Mullen, M. J., R. K. Kharbanda, et al. (2001). "Heterogenous nature of flow-mediated dilatation in human conduit arteries in vivo: relevance to endothelial dysfunction in hypercholesterolemia." Circ Res **88**(2): 145-51.
- Mund, J. A., M. L. Estes, et al. (2012). "Flow cytometric identification and functional characterization of immature and mature circulating endothelial cells." Arterioscler Thromb Vasc Biol **32**(4): 1045-53.
- Murasawa, S. and T. Asahara (2005). "Endothelial progenitor cells for vasculogenesis." Physiology (Bethesda) **20**: 36-42.
- Murayama, T., O. M. Tepper, et al. (2002). "Determination of bone marrow-derived endothelial progenitor cell significance in angiogenic growth factor-induced neovascularization in vivo." Exp Hematol **30**(8): 967-72.
- Murphy, C., G. S. Kanaganayagam, et al. (2007). "Vascular dysfunction and reduced circulating endothelial progenitor cells in young healthy UK South Asian men." Arterioscler Thromb Vasc Biol **27**(4): 936-42.
- Mutin, M., I. Canavy, et al. (1999). "Direct evidence of endothelial injury in acute myocardial infarction and unstable angina by demonstration of circulating endothelial cells." Blood **93**(9): 2951-8.
- Mutunga, M., B. Fulton, et al. (2001). "Circulating endothelial cells in patients with septic shock." Am J Respir Crit Care Med **163**(1): 195-200.
- Nadar, S. K., G. Y. Lip, et al. (2005). "Circulating endothelial cells in acute ischaemic stroke." Thromb Haemost **94**(4): 707-12.
- Naik, R. P., D. Jin, et al. (2008). "Circulating endothelial progenitor cells correlate to stage in patients with invasive breast cancer." Breast Cancer Res Treat **107**(1): 133-8.
- Naito, H., H. Kidoya, et al. (2011). "Identification and characterization of a resident vascular stem/progenitor cell population in preexisting blood vessels." Embo J **31**(4): 842-55.
- Nakatani, K., S. Takeshita, et al. (2003). "Circulating endothelial cells in Kawasaki disease." Clin Exp Immunol **131**(3): 536-40.
- Napoli, C., B. Farzati, et al. (2008). "Beneficial effects of autologous bone marrow cell infusion and antioxidants/L-arginine in patients with chronic critical limb ischemia." Eur J Cardiovasc Prev Rehabil **15**(6): 709-18.

- Natori, T., M. Sata, et al. (2002). "G-CSF stimulates angiogenesis and promotes tumor growth: potential contribution of bone marrow-derived endothelial progenitor cells." Biochem Biophys Res Commun **297**(4): 1058-61.
- Neunteufl, T., R. Katzenschlager, et al. (1997). "Systemic endothelial dysfunction is related to the extent and severity of coronary artery disease." Atherosclerosis **129**(1): 111-8.
- Newcomer, S. C., U. A. Leuenberger, et al. (2004). "Different vasodilator responses of human arms and legs." J Physiol **556**(Pt 3): 1001-11.
- Nizankowski, R., T. Petriczek, et al. (2005). "The treatment of advanced chronic lower limb ischaemia with marrow stem cell autotransplantation." Kardiol Pol **63**(4): 351-60; discussion 361.
- Nozaki, T., S. Sugiyama, et al. (2009). "Significance of a multiple biomarkers strategy including endothelial dysfunction to improve risk stratification for cardiovascular events in patients at high risk for coronary heart disease." J Am Coll Cardiol **54**(7): 601-8.
- Oh, I. Y., C. H. Yoon, et al. (2007). "Involvement of E-selectin in recruitment of endothelial progenitor cells and angiogenesis in ischemic muscle." Blood **110**(12): 3891-9.
- Oliveras, A., M. J. Soler, et al. (2008). "Endothelial progenitor cells are reduced in refractory hypertension." J Hum Hypertens **22**(3): 183-90.
- Oppliger Leibundgut, E., M. P. Horn, et al. (2006). "Hematopoietic and endothelial progenitor cell trafficking in patients with myeloproliferative diseases." Haematologica **91**(11): 1465-72.
- Ormiston, M. L., Y. Deng, et al. (2009). "Innate immunity in the therapeutic actions of endothelial progenitor cells in pulmonary hypertension." Am J Respir Cell Mol Biol **43**(5): 546-54.
- Otani, A., K. Kinder, et al. (2002). "Bone marrow-derived stem cells target retinal astrocytes and can promote or inhibit retinal angiogenesis." Nat Med **8**(9): 1004-10.
- Ott, I., U. Keller, et al. (2005). "Endothelial-like cells expanded from CD34+ blood cells improve left ventricular function after experimental myocardial infarction." Faseb J **19**(8): 992-4.
- Palange, P., U. Testa, et al. (2006). "Circulating haemopoietic and endothelial progenitor cells are decreased in COPD." Eur Respir J **27**(3): 529-41.
- Pasquier, E., N. Bardin, et al. (2005). "The first assessment of soluble CD146 in women with unexplained pregnancy loss. A new insight?" Thromb Haemost **94**(6): 1280-4.
- Peacock, A. J., N. F. Murphy, et al. (2007). "An epidemiological study of pulmonary arterial hypertension." Eur Respir J **30**(1): 104-9.
- Peichev, M., A. J. Naiyer, et al. (2000). "Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating human CD34(+) cells identifies a population of functional endothelial precursors." Blood **95**(3): 952-8.
- Pelliccia, F., V. Pasceri, et al. (2009). "Numbers of endothelial progenitor cells in peripheral blood are similar in younger and older patients with coronary artery disease." Int J Cardiol **133**(2): 277-9.
- Pelosi, E., M. Valtieri, et al. (2002). "Identification of the hemangioblast in postnatal life." Blood **100**(9): 3203-8.

- Perin, E. C., G. V. Silva, et al. (2011). "A randomized study of transendocardial injection of autologous bone marrow mononuclear cells and cell function analysis in ischemic heart failure (FOCUS-HF)." Am Heart J **161**(6): 1078-87 e3.
- Piaggio, G., V. Rosti, et al. (2009). "Endothelial colony-forming cells from patients with chronic myeloproliferative disorders lack the disease-specific molecular clonality marker." Blood **114**(14): 3127-30.
- Piccin, A., W. G. Murphy, et al. (2007). "Circulating microparticles: pathophysiology and clinical implications." Blood Rev **21**(3): 157-71.
- Pignon, B., M. A. Sevestre, et al. (2007). "Histological changes after implantation of autologous bone marrow mononuclear cells for chronic critical limb ischemia." Bone Marrow Transplant **39**(10): 647-8.
- Piqueras, L., A. R. Reynolds, et al. (2007). "Activation of PPARbeta/delta induces endothelial cell proliferation and angiogenesis." Arterioscler Thromb Vasc Biol **27**(1): 63-9.
- Pirro, M., G. Schillaci, et al. (2006). "Increased ratio of CD31+/CD42- microparticles to endothelial progenitors as a novel marker of atherosclerosis in hypercholesterolemia." Arterioscler Thromb Vasc Biol **26**(11): 2530-5.
- Planat-Benard, V., J. S. Silvestre, et al. (2004). "Plasticity of human adipose lineage cells toward endothelial cells: physiological and therapeutic perspectives." Circulation **109**(5): 656-63.
- Povsic, T. J., K. L. Zavodni, et al. (2009). "Common endothelial progenitor cell assays identify discrete endothelial progenitor cell populations." Am Heart J **157**(2): 335-44.
- Povsic, T. J., J. Zhou, et al. (2010). "Aging is not associated with bone marrow-resident progenitor cell depletion." J Gerontol A Biol Sci Med Sci **65**(10): 1042-50.
- Powell, T. M., J. D. Paul, et al. (2005). "Granulocyte colony-stimulating factor mobilizes functional endothelial progenitor cells in patients with coronary artery disease." Arterioscler Thromb Vasc Biol **25**(2): 296-301.
- Prochazka, V., J. Gumulec, et al. (2009). "Autologous bone marrow stem cell transplantation in patients with end-stage chronic critical limb ischemia and diabetic foot." Vnitr Lek **55**(3): 173-8.
- Prokopi, M., G. Pula, et al. (2009). "Proteomic analysis reveals presence of platelet microparticles in endothelial progenitor cell cultures." Blood **114**(3): 723-32.
- Pullamsetti, S., L. Kiss, et al. (2005). "Increased levels and reduced catabolism of asymmetric and symmetric dimethylarginines in pulmonary hypertension." Faseb J **19**(9): 1175-7.
- Pyke, K. E. and M. E. Tschakovsky (2005). "The relationship between shear stress and flow-mediated dilatation: implications for the assessment of endothelial function." J Physiol **568**(Pt 2): 357-69.
- Quilici, J., N. Banzet, et al. (2004). "Circulating endothelial cell count as a diagnostic marker for non-ST-elevation acute coronary syndromes." Circulation **110**(12): 1586-91.
- Rabinovitch, M. (2008). "Molecular pathogenesis of pulmonary arterial hypertension." J Clin Invest **118**(7): 2372-9.
- Raitakari, O. T., M. Juonala, et al. (2003). "Cardiovascular risk factors in childhood and carotid artery intima-media thickness in adulthood: the Cardiovascular Risk in Young Finns Study." Jama **290**(17): 2277-83.

- Raoul, W., O. Wagner-Ballon, et al. (2007). "Effects of bone marrow-derived cells on monocrotaline- and hypoxia-induced pulmonary hypertension in mice." Respir Res **8**: 8.
- Rehman, J., J. Li, et al. (2003). "Peripheral blood "endothelial progenitor cells" are derived from monocyte/macrophages and secrete angiogenic growth factors." Circulation **107**(8): 1164-9.
- Reinisch, A., N. A. Hofmann, et al. (2009). "Humanized large-scale expanded endothelial colony-forming cells function in vitro and in vivo." Blood **113**(26): 6716-25.
- Reyes, M., A. Dudek, et al. (2002). "Origin of endothelial progenitors in human postnatal bone marrow." J Clin Invest **109**(3): 337-46.
- Ripa, R. S. and J. Kastrup (2008). "G-CSF therapy with mobilization of bone marrow stem cells for myocardial recovery after acute myocardial infarction--a relevant treatment?" Exp Hematol **36**(6): 681-6.
- Risau, W. and I. Flamme (1995). "Vasculogenesis." Annu Rev Cell Dev Biol **11**: 73-91.
- Rivard, A., L. Berthou-Soulie, et al. (2000). "Age-dependent defect in vascular endothelial growth factor expression is associated with reduced hypoxia-inducible factor 1 activity." J Biol Chem **275**(38): 29643-7.
- Rivard, A., J. E. Fabre, et al. (1999). "Age-dependent impairment of angiogenesis." Circulation **99**(1): 111-20.
- Robert, S., P. Poncelet, et al. (2009). "Standardization of platelet-derived microparticle counting using calibrated beads and a Cytomics FC500 routine flow cytometer: a first step towards multicenter studies?" J Thromb Haemost **7**(1): 190-7.
- Rohde, E., C. Malischnik, et al. (2006). "Blood monocytes mimic endothelial progenitor cells." Stem Cells **24**(2): 357-67.
- Roncalli, J., F. Mouquet, et al. (2011). "Intracoronary autologous mononucleated bone marrow cell infusion for acute myocardial infarction: results of the randomized multicenter BONAMI trial." Eur Heart J **32**(14): 1748-57.
- Rowand, J. L., G. Martin, et al. (2007). "Endothelial cells in peripheral blood of healthy subjects and patients with metastatic carcinomas." Cytometry A **71**(2): 105-13.
- Sabatier, F., R. Lacroix, et al. (2011). "[Circulating endothelial cells, microparticles and progenitors: towards the definition of vascular competence]." Rev Med Interne **32**(1): 54-63.
- Sahara, M., M. Sata, et al. (2007). "Diverse contribution of bone marrow-derived cells to vascular remodeling associated with pulmonary arterial hypertension and arterial neointimal formation." Circulation **115**(4): 509-17.
- Saigawa, T., K. Kato, et al. (2004). "Clinical application of bone marrow implantation in patients with arteriosclerosis obliterans, and the association between efficacy and the number of implanted bone marrow cells." Circ J **68**(12): 1189-93.
- Saito, Y., K. Sasaki, et al. (2007). "Effect of autologous bone-marrow cell transplantation on ischemic ulcer in patients with Buerger's disease." Circ J **71**(8): 1187-92.
- Sakamaki, F. (2001). "[Coagulation and fibrinolytic abnormality related to endothelial injury in pulmonary arterial hypertension]." Nihon Rinsho **59**(6): 1053-8.

- Sakao, S., L. Taraseviciene-Stewart, et al. (2007). "VEGF-R blockade causes endothelial cell apoptosis, expansion of surviving CD34+ precursor cells and transdifferentiation to smooth muscle-like and neuronal-like cells." Faseb J **21**(13): 3640-52.
- Sakao, S., L. Taraseviciene-Stewart, et al. (2005). "Initial apoptosis is followed by increased proliferation of apoptosis-resistant endothelial cells." Faseb J **19**(9): 1178-80.
- Sakao, S., K. Tatsumi, et al. (2009). "Endothelial cells and pulmonary arterial hypertension: apoptosis, proliferation, interaction and transdifferentiation." Respir Res **10**: 95.
- Sala, E., C. Villena, et al. (2010). "Abnormal levels of circulating endothelial progenitor cells during exacerbations of COPD." Lung **188**(4): 331-8.
- Sampol, J. and F. George (1995). "[Measurement of biological parameters of endothelial origin: value in human pathology]." Ann Biol Clin (Paris) **53**(6): 329-38.
- Sanchez, O., M. Humbert, et al. (2010). "[Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension]." Rev Mal Respir **27**(2): 141-50.
- Sandri, M., V. Adams, et al. (2005). "Effects of exercise and ischemia on mobilization and functional activation of blood-derived progenitor cells in patients with ischemic syndromes: results of 3 randomized studies." Circulation **111**(25): 3391-9.
- Sasaki, K., C. Heeschen, et al. (2006). "Ex vivo pretreatment of bone marrow mononuclear cells with endothelial NO synthase enhancer AVE9488 enhances their functional activity for cell therapy." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(39): 14537-41.
- Satoh, K., Y. Fukumoto, et al. (2009). "Statin ameliorates hypoxia-induced pulmonary hypertension associated with down-regulated stromal cell-derived factor-1." Cardiovasc Res **81**(1): 226-34.
- Satoh, K., Y. Kagaya, et al. (2006). "Important role of endogenous erythropoietin system in recruitment of endothelial progenitor cells in hypoxia-induced pulmonary hypertension in mice." Circulation **113**(11): 1442-50.
- Sbarbati, R., M. de Boer, et al. (1991). "Immunologic detection of endothelial cells in human whole blood." Blood **77**(4): 764-9.
- Schachinger, V., B. Assmus, et al. (2004). "Transplantation of progenitor cells and regeneration enhancement in acute myocardial infarction: final one-year results of the TOPCARE-AMI Trial." J Am Coll Cardiol **44**(8): 1690-9.
- Schachinger, V., B. Assmus, et al. (2009). "Intracoronary infusion of bone marrow-derived mononuclear cells abrogates adverse left ventricular remodelling post-acute myocardial infarction: insights from the reinfusion of enriched progenitor cells and infarct remodelling in acute myocardial infarction (REPAIR-AMI) trial." Eur J Heart Fail **11**(10): 973-9.
- Schachinger, V., S. Erbs, et al. (2006). "Improved clinical outcome after intracoronary administration of bone-marrow-derived progenitor cells in acute myocardial infarction: final 1-year results of the REPAIR-AMI trial." Eur Heart J **27**(23): 2775-83.
- Schatteman, G. C., H. D. Hanlon, et al. (2000). "Blood-derived angioblasts accelerate blood-flow restoration in diabetic mice." J Clin Invest **106**(4): 571-8.
- Scheubel, R. J., H. Zorn, et al. (2003). "Age-dependent depression in circulating endothelial progenitor cells in patients undergoing coronary artery bypass grafting." J Am Coll Cardiol **42**(12): 2073-80.



- Schlieper, G., M. Hristov, et al. (2008). "Predictors of low circulating endothelial progenitor cell numbers in haemodialysis patients." Nephrol Dial Transplant **23**(8): 2611-8.
- Schmidt-Lucke, C., S. Fichtlscherer, et al. (2010). "Quantification of circulating endothelial progenitor cells using the modified ISHAGE protocol." PLoS One **5**(11): e13790.
- Schmidt-Lucke, C., L. Rossig, et al. (2005). "Reduced number of circulating endothelial progenitor cells predicts future cardiovascular events: proof of concept for the clinical importance of endogenous vascular repair." Circulation **111**(22): 2981-7.
- Shaffer, R. G., S. Greene, et al. (2006). "Flow cytometric measurement of circulating endothelial cells: the effect of age and peripheral arterial disease on baseline levels of mature and progenitor populations." Cytometry B Clin Cytom **70**(2): 56-62.
- Shaked, Y., A. Ciarrocchi, et al. (2006). "Therapy-induced acute recruitment of circulating endothelial progenitor cells to tumors." Science **313**(5794): 1785-7.
- Sharpe, E. E., 3rd, A. A. Teleron, et al. (2006). "The origin and in vivo significance of murine and human culture-expanded endothelial progenitor cells." Am J Pathol **168**(5): 1710-21.
- Shepherd, R. M., B. J. Capoccia, et al. (2006). "Angiogenic cells can be rapidly mobilized and efficiently harvested from the blood following treatment with AMD3100." Blood **108**(12): 3662-7.
- Shet, A. S., O. Aras, et al. (2003). "Sickle blood contains tissue factor-positive microparticles derived from endothelial cells and monocytes." Blood **102**(7): 2678-83.
- Shi, Q., S. Rafii, et al. (1998). "Evidence for circulating bone marrow-derived endothelial cells." Blood **92**(2): 362-7.
- Shintani, S., T. Murohara, et al. (2001). "Mobilization of endothelial progenitor cells in patients with acute myocardial infarction." Circulation **103**(23): 2776-9.
- Siljander, P. R. (2011). "Platelet-derived microparticles - an updated perspective." Thromb Res **127 Suppl 2**: S30-3.
- Simak, J., M. P. Gelderman, et al. (2006). "Circulating endothelial microparticles in acute ischemic stroke: a link to severity, lesion volume and outcome." J Thromb Haemost **4**(6): 1296-302.
- Simonneau, G., I. M. Robbins, et al. (2009). "Updated clinical classification of pulmonary hypertension." J Am Coll Cardiol **54**(1 Suppl): S43-54.
- Singh, N., S. Prasad, et al. (2002). "Ageing is associated with impairment of nitric oxide and prostanoid dilator pathways in the human forearm." Clin Sci (Lond) **102**(5): 595-600.
- Smadja, D. M., I. Bieche, et al. (2006). "PAR-1 activation has different effects on the angiogenic activity of endothelial progenitor cells derived from human adult and cord blood." J Thromb Haemost **4**(12): 2729-31.
- Smadja, D. M., I. Bieche, et al. (2007). "Increased VEGFR2 expression during human late endothelial progenitor cells expansion enhances in vitro angiogenesis with up-regulation of integrin alpha(6)." J Cell Mol Med **11**(5): 1149-61.
- Smadja, D. M., I. Bieche, et al. (2008). "Bone morphogenetic proteins 2 and 4 are selectively expressed by late outgrowth endothelial progenitor cells and promote neoangiogenesis." Arterioscler Thromb Vasc Biol **28**(12): 2137-43.

- Smadja, D. M., I. Bieche, et al. (2008). "Interleukin 8 is differently expressed and modulated by PAR-1 activation in early and late endothelial progenitor cells." J Cell Mol Med.
- Smadja, D. M., C. d'Audigier, et al. (2012). "Angiogenic potential of BM MSCs derived from patients with critical leg ischemia." Bone Marrow Transplant **47**(7): 997-1000.
- Smadja, D. M., C. d'Audigier, et al. (2010). "The Wnt antagonist Dickkopf-1 increases endothelial progenitor cell angiogenic potential." Arterioscler Thromb Vasc Biol **30**(12): 2544-52.
- Smadja, D. M., L. Mauge, et al. (2009). "Blood outgrowth endothelial cells from cord blood and peripheral blood: angiogenesis-related characteristics in vitro: a rebuttal." J Thromb Haemost **7**(3): 504-6; author reply 506-8.
- Smirnov, D. A., B. W. Foulk, et al. (2006). "Global gene expression profiling of circulating endothelial cells in patients with metastatic carcinomas." Cancer Res **66**(6): 2918-22.
- Sobrinho, T., O. Hurtado, et al. (2007). "The increase of circulating endothelial progenitor cells after acute ischemic stroke is associated with good outcome." Stroke **38**(10): 2759-64.
- Solovey, A., Y. Lin, et al. (1997). "Circulating activated endothelial cells in sickle cell anemia." N Engl J Med **337**(22): 1584-90.
- Soriano, A. O., W. Jy, et al. (2005). "Levels of endothelial and platelet microparticles and their interactions with leukocytes negatively correlate with organ dysfunction and predict mortality in severe sepsis." Crit Care Med **33**(11): 2540-6.
- Spees, J. L., M. J. Whitney, et al. (2008). "Bone marrow progenitor cells contribute to repair and remodeling of the lung and heart in a rat model of progressive pulmonary hypertension." Faseb J **22**(4): 1226-36.
- Steiner, S., A. Niessner, et al. (2005). "Endurance training increases the number of endothelial progenitor cells in patients with cardiovascular risk and coronary artery disease." Atherosclerosis **181**(2): 305-10.
- Stenmark, K. R., B. Meyrick, et al. (2009). "Animal models of pulmonary arterial hypertension: the hope for etiological discovery and pharmacological cure." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **297**(6): L1013-32.
- Strauer, B. E., M. Yousef, et al. (2010). "The acute and long-term effects of intracoronary Stem cell Transplantation in 191 patients with chronic heart failure: the STAR-heart study." Eur J Heart Fail **12**(7): 721-9.
- Strehlow, K., N. Werner, et al. (2003). "Estrogen increases bone marrow-derived endothelial progenitor cell production and diminishes neointima formation." Circulation **107**(24): 3059-65.
- Strijbos, M. H., J. Kraan, et al. (2007). "Cells meeting our immunophenotypic criteria of endothelial cells are large platelets." Cytometry B Clin Cytom **72**(2): 86-93.
- Strijbos, M. H., B. A. van Krimpen, et al. (2010). "mRNA levels of CD31, CD144, CD146 and von Willebrand factor do not serve as surrogate markers for circulating endothelial cells." Thromb Haemost **104**(2): 318-26.
- Sugihara, S., Y. Yamamoto, et al. (2006). "Autoperipheral blood mononuclear cell transplantation improved giant ulcers due to chronic arteriosclerosis obliterans." Heart Vessels **21**(4): 258-62.

- Sugiyama, T., H. Kohara, et al. (2006). "Maintenance of the hematopoietic stem cell pool by CXCL12-CXCR4 chemokine signaling in bone marrow stromal cell niches." Immunity **25**(6): 977-88.
- Sullivan, C. C., L. Du, et al. (2003). "Induction of pulmonary hypertension by an angiopoietin 1/TIE2/serotonin pathway." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(21): 12331-6.
- Sumpio, B. E., J. T. Riley, et al. (2002). "Cells in focus: endothelial cell." Int J Biochem Cell Biol **34**(12): 1508-12.
- Suri, C., P. F. Jones, et al. (1996). "Requisite role of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, during embryonic angiogenesis." Cell **87**(7): 1171-80.
- Swift, M. E., H. K. Kleinman, et al. (1999). "Impaired wound repair and delayed angiogenesis in aged mice." Lab Invest **79**(12): 1479-87.
- Taddei, S., A. Virdis, et al. (1995). "Aging and endothelial function in normotensive subjects and patients with essential hypertension." Circulation **91**(7): 1981-7.
- Takahashi, H. and L. A. Harker (1983). "Measurement of human endothelial cells in whole blood." Thromb Res **31**(1): 1-12.
- Takahashi, T., C. Kalka, et al. (1999). "Ischemia- and cytokine-induced mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for neovascularization." Nat Med **5**(4): 434-8.
- Takamiya, M., M. Okigaki, et al. (2006). "Granulocyte colony-stimulating factor-mobilized circulating c-Kit<sup>+</sup>/Flk-1<sup>+</sup> progenitor cells regenerate endothelium and inhibit neointimal hyperplasia after vascular injury." Arterioscler Thromb Vasc Biol **26**(4): 751-7.
- Tamarat, R., J. S. Silvestre, et al. (2004). "Impairment in ischemia-induced neovascularization in diabetes: bone marrow mononuclear cell dysfunction and therapeutic potential of placenta growth factor treatment." Am J Pathol **164**(2): 457-66.
- Tamby, M. C., Y. Chanseaud, et al. (2005). "Anti-endothelial cell antibodies in idiopathic and systemic sclerosis associated pulmonary arterial hypertension." Thorax **60**(9): 765-72.
- Tao, J., Y. Wang, et al. (2006). "Circulating endothelial progenitor cell deficiency contributes to impaired arterial elasticity in persons of advancing age." J Hum Hypertens **20**(7): 490-5.
- Tateishi-Yuyama, E., H. Matsubara, et al. (2002). "Therapeutic angiogenesis for patients with limb ischaemia by autologous transplantation of bone-marrow cells: a pilot study and a randomised controlled trial." Lancet **360**(9331): 427-35.
- Teichert-Kuliszewska, K., M. J. Kutryk, et al. (2006). "Bone morphogenetic protein receptor-2 signaling promotes pulmonary arterial endothelial cell survival: implications for loss-of-function mutations in the pathogenesis of pulmonary hypertension." Circ Res **98**(2): 209-17.
- Tendera, M., W. Wojakowski, et al. (2009). "Intracoronary infusion of bone marrow-derived selected CD34<sup>+</sup>CXCR4<sup>+</sup> cells and non-selected mononuclear cells in patients with acute STEMI and reduced left ventricular ejection fraction: results of randomized, multicentre Myocardial Regeneration by Intracoronary Infusion of Selected Population of Stem Cells in Acute Myocardial Infarction (REGENT) Trial." Eur Heart J **30**(11): 1313-21.

- Tepper, O. M., R. D. Galiano, et al. (2002). "Human endothelial progenitor cells from type II diabetics exhibit impaired proliferation, adhesion, and incorporation into vascular structures." Circulation **106**(22): 2781-6.
- Thijssen, D. H., J. B. Vos, et al. (2006). "Haematopoietic stem cells and endothelial progenitor cells in healthy men: effect of aging and training." Aging Cell **5**(6): 495-503.
- Thorin-Trescases, N., G. Voghel, et al. (2010). "[Age-dependent oxidative stress: toward an irreversible failure in endothelial maintenance]." Med Sci (Paris) **26**(10): 875-80.
- Thum, T., D. Tsikas, et al. (2005). "Suppression of endothelial progenitor cells in human coronary artery disease by the endogenous nitric oxide synthase inhibitor asymmetric dimethylarginine." J Am Coll Cardiol **46**(9): 1693-701.
- Timmermans, F., J. Plum, et al. (2009). "Endothelial progenitor cells: identity defined?" J Cell Mol Med **13**(1): 87-102.
- Timmermans, F., F. Van Hauwermeiren, et al. (2007). "Endothelial outgrowth cells are not derived from CD133+ cells or CD45+ hematopoietic precursors." Arterioscler Thromb Vasc Biol **27**(7): 1572-9.
- Tortora, G. and B. Derrickson, Eds. (2009). Manuel d'anatomie et de physiologie humaines, De Boeck.
- Toshner, M., R. Voswinckel, et al. (2009). "Evidence of dysfunction of endothelial progenitors in pulmonary arterial hypertension." Am J Respir Crit Care Med **180**(8): 780-7.
- Tse, H. F., S. Thambar, et al. (2007). "Prospective randomized trial of direct endomyocardial implantation of bone marrow cells for treatment of severe coronary artery diseases (PROTECT-CAD trial)." Eur Heart J **28**(24): 2998-3005.
- Tuder, R. M., M. Chacon, et al. (2001). "Expression of angiogenesis-related molecules in plexiform lesions in severe pulmonary hypertension: evidence for a process of disordered angiogenesis." J Pathol **195**(3): 367-74.
- Tuder, R. M., S. D. Lee, et al. (1998). "Histopathology of pulmonary hypertension." Chest **114**(1 Suppl): 1S-6S.
- Tura, O., G. R. Barclay, et al. (2007). "Absence of a relationship between immunophenotypic and colony enumeration analysis of endothelial progenitor cells in clinical haematopoietic cell sources." J Transl Med **5**: 37.
- Tura, O., J. Crawford, et al. (2010). "Granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) depresses angiogenesis in vivo and in vitro: implications for sourcing cells for vascular regeneration therapy." J Thromb Haemost **8**(7): 1614-23.
- Tushuizen, M. E., M. Diamant, et al. (2011). "Cell-derived microparticles in the pathogenesis of cardiovascular disease: friend or foe?" Arterioscler Thromb Vasc Biol **31**(1): 4-9.
- Vaitkevicius, P. V., J. L. Fleg, et al. (1993). "Effects of age and aerobic capacity on arterial stiffness in healthy adults." Circulation **88**(4 Pt 1): 1456-62.
- Valgimigli, M., G. M. Rigolin, et al. (2004). "CD34+ and endothelial progenitor cells in patients with various degrees of congestive heart failure." Circulation **110**(10): 1209-12.

- Van Craenenbroeck, E. M., V. M. Conraads, et al. (2008). "Quantification of circulating endothelial progenitor cells: a methodological comparison of six flow cytometric approaches." J Immunol Methods **332**(1-2): 31-40.
- van Hinsbergh, V. W. (2012). "Endothelium--role in regulation of coagulation and inflammation." Semin Immunopathol **34**(1): 93-106.
- van Ramshorst, J., D. E. Atsma, et al. (2009). "Effect of intramyocardial bone marrow cell injection on left ventricular dyssynchrony and global strain." Heart **95**(2): 119-24.
- Van Tongeren, R. B., J. F. Hamming, et al. (2008). "Intramuscular or combined intramuscular/intra-arterial administration of bone marrow mononuclear cells: a clinical trial in patients with advanced limb ischemia." J Cardiovasc Surg (Torino) **49**(1): 51-8.
- Vanneaux, V., F. El-Ayoubi, et al. (2010). "In vitro and in vivo analysis of endothelial progenitor cells from cryopreserved umbilical cord blood: are we ready for clinical application?" Cell Transplant.
- Vasa, M., S. Fichtlscherer, et al. (2001). "Increase in circulating endothelial progenitor cells by statin therapy in patients with stable coronary artery disease." Circulation **103**(24): 2885-90.
- Vasa, M., S. Fichtlscherer, et al. (2001). "Number and migratory activity of circulating endothelial progenitor cells inversely correlate with risk factors for coronary artery disease." Circ Res **89**(1): E1-7.
- Virmani, R., F. D. Kolodgie, et al. (2005). "Atherosclerotic plaque progression and vulnerability to rupture: angiogenesis as a source of intraplaque hemorrhage." Arterioscler Thromb Vasc Biol **25**(10): 2054-61.
- Vlachopoulos, C., K. Aznaouridis, et al. (2006). "Clinical appraisal of arterial stiffness: the Argonauts in front of the Golden Fleece." Heart **92**(11): 1544-50.
- Vongpatanasin, W., M. E. Brickner, et al. (1998). "The Eisenmenger syndrome in adults." Ann Intern Med **128**(9): 745-55.
- Walter, D. H., H. Krankenberg, et al. (2011). "Intraarterial administration of bone marrow mononuclear cells in patients with critical limb ischemia: a randomized-start, placebo-controlled pilot trial (PROVASA)." Circ Cardiovasc Interv **4**(1): 26-37.
- Wang, J. S., X. Liu, et al. (2011). "Effects of aging on time course of neovascularization-related gene expression following acute hindlimb ischemia in mice." Chin Med J (Engl) **124**(7): 1075-81.
- Wang, X., J. Chen, et al. (2004). "Effects of ox-LDL on number and activity of circulating endothelial progenitor cells." Drug Chem Toxicol **27**(3): 243-55.
- Wang, X. X., F. R. Zhang, et al. (2007). "Transplantation of autologous endothelial progenitor cells may be beneficial in patients with idiopathic pulmonary arterial hypertension: a pilot randomized controlled trial." J Am Coll Cardiol **49**(14): 1566-71.
- Werner, N., S. Kosiol, et al. (2005). "Circulating endothelial progenitor cells and cardiovascular outcomes." N Engl J Med **353**(10): 999-1007.
- Werner, N., S. Wassmann, et al. (2007). "Endothelial progenitor cells correlate with endothelial function in patients with coronary artery disease." Basic Res Cardiol **102**(6): 565-71.

- Wester, T., J. J. Jorgensen, et al. (2008). "Treatment with autologous bone marrow mononuclear cells in patients with critical lower limb ischaemia. A pilot study." Scand J Surg **97**(1): 56-62.
- Westerweel, P. E. and M. C. Verhaar (2009). "Endothelial progenitor cell dysfunction in rheumatic disease." Nat Rev Rheumatol **5**(6): 332-40.
- White, R. J., D. F. Meoli, et al. (2007). "Plexiform-like lesions and increased tissue factor expression in a rat model of severe pulmonary arterial hypertension." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **293**(3): L583-90.
- Widemann, A., F. Sabatier, et al. (2008). "CD146-based immunomagnetic enrichment followed by multiparameter flow cytometry: a new approach to counting circulating endothelial cells." J Thromb Haemost **6**(5): 869-76.
- Wilkins, M. R. (2012). "Pulmonary hypertension: the science behind the disease spectrum." Eur Respir Rev **21**(123): 19-26.
- Williams, B., P. S. Lacy, et al. (2006). "Differential impact of blood pressure-lowering drugs on central aortic pressure and clinical outcomes: principal results of the Conduit Artery Function Evaluation (CAFE) study." Circulation **113**(9): 1213-25.
- Woo, K. S., P. Chook, et al. (2004). "Effects of diet and exercise on obesity-related vascular dysfunction in children." Circulation **109**(16): 1981-6.
- Woywodt, A., F. H. Bahlmann, et al. (2002). "Circulating endothelial cells: life, death, detachment and repair of the endothelial cell layer." Nephrol Dial Transplant **17**(10): 1728-30.
- Woywodt, A., A. D. Blann, et al. (2006). "Isolation and enumeration of circulating endothelial cells by immunomagnetic isolation: proposal of a definition and a consensus protocol." J Thromb Haemost **4**(3): 671-7.
- Woywodt, A., C. Goldberg, et al. (2004). "An improved assay for enumeration of circulating endothelial cells." Ann Hematol **83**(8): 491-4.
- Woywodt, A., J. Scheer, et al. (2004). "Circulating endothelial cells as a marker of endothelial damage in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation." Blood **103**(9): 3603-5.
- Woywodt, A., M. Schroeder, et al. (2003). "Elevated numbers of circulating endothelial cells in renal transplant recipients." Transplantation **76**(1): 1-4.
- Woywodt, A., F. Streiber, et al. (2003). "Circulating endothelial cells as markers for ANCA-associated small-vessel vasculitis." Lancet **361**(9353): 206-10.
- Wray, D. W., A. Uberoi, et al. (2006). "Evidence of preserved endothelial function and vascular plasticity with age." Am J Physiol Heart Circ Physiol **290**(3): H1271-7.
- Wu, X., M. W. Lensch, et al. (2007). "Hemogenic endothelial progenitor cells isolated from human umbilical cord blood." Stem Cells **25**(11): 2770-6.
- Xu, W., T. Koeck, et al. (2007). "Alterations of cellular bioenergetics in pulmonary artery endothelial cells." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(4): 1342-7.
- Yan, X., Y. Lin, et al. (2003). "A novel anti-CD146 monoclonal antibody, AA98, inhibits angiogenesis and tumor growth." Blood **102**(1): 184-91.
- Yao, K., R. Huang, et al. (2008). "Administration of intracoronary bone marrow mononuclear cells on chronic myocardial infarction improves diastolic function." Heart **94**(9): 1147-53.

- Yao, W., A. L. Firth, et al. (2009). "Identification of putative endothelial progenitor cells (CD34+CD133+Flk-1+) in endarterectomized tissue of patients with chronic thromboembolic pulmonary hypertension." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **296**(6): L870-8.
- Yoder, M. C. (2009). "Defining human endothelial progenitor cells." J Thromb Haemost **7 Suppl 1**: 49-52.
- Yoder, M. C. (2010). "Is endothelium the origin of endothelial progenitor cells?" Arterioscler Thromb Vasc Biol **30**(6): 1094-103.
- Yoder, M. C. and D. A. Ingram (2009). "The definition of EPCs and other bone marrow cells contributing to neoangiogenesis and tumor growth: is there common ground for understanding the roles of numerous marrow-derived cells in the neoangiogenic process?" Biochim Biophys Acta **1796**(1): 50-4.
- Yoder, M. C., L. E. Mead, et al. (2007). "Redefining endothelial progenitor cells via clonal analysis and hematopoietic stem/progenitor cell principals." Blood **109**(5): 1801-9.
- Yoon, C. H., J. Hur, et al. (2005). "Synergistic neovascularization by mixed transplantation of early endothelial progenitor cells and late outgrowth endothelial cells: the role of angiogenic cytokines and matrix metalloproteinases." Circulation **112**(11): 1618-27.
- Young, K. C., E. Torres, et al. (2009). "Inhibition of the SDF-1/CXCR4 axis attenuates neonatal hypoxia-induced pulmonary hypertension." Circ Res **104**(11): 1293-301.
- Yun, C. H., K. H. Jung, et al. (2010). "Increased circulating endothelial microparticles and carotid atherosclerosis in obstructive sleep apnea." J Clin Neurol **6**(2): 89-98.
- Zemani, F., J. S. Silvestre, et al. (2008). "Ex vivo priming of endothelial progenitor cells with SDF-1 before transplantation could increase their proangiogenic potential." Arterioscler Thromb Vasc Biol **28**(4): 644-50.
- Zengin, E., F. Chalajour, et al. (2006). "Vascular wall resident progenitor cells: a source for postnatal vasculogenesis." Development **133**(8): 1543-51.
- Zerbini, G., M. Lorenzi, et al. (2008). "Tumor angiogenesis." N Engl J Med **359**(7): 763; author reply 764.
- Zhang, S. J., H. Zhang, et al. (2007). "Is it possible to obtain "true endothelial progenitor cells" by in vitro culture of bone marrow mononuclear cells?" Stem Cells Dev **16**(4): 683-90.
- Zhang, Y., B. S. Herbert, et al. (2009). "Premature senescence of highly proliferative endothelial progenitor cells is induced by tumor necrosis factor-alpha via the p38 mitogen-activated protein kinase pathway." Faseb J **23**(5): 1358-65.
- Zhao, Y. D., A. I. Campbell, et al. (2003). "Protective role of angiopoietin-1 in experimental pulmonary hypertension." Circ Res **92**(9): 984-91.
- Zhao, Y. D., D. W. Courtman, et al. (2005). "Rescue of monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension using bone marrow-derived endothelial-like progenitor cells: efficacy of combined cell and eNOS gene therapy in established disease." Circ Res **96**(4): 442-50.
- Zhu, D. Z., C. F. Cheng, et al. (1991). "Mediation of lung metastasis of murine melanomas by a lung-specific endothelial cell adhesion molecule." Proc Natl Acad Sci U S A **88**(21): 9568-72.

- Zhu, J. H., X. X. Wang, et al. (2008). "Safety and efficacy of autologous endothelial progenitor cells transplantation in children with idiopathic pulmonary arterial hypertension: open-label pilot study." Pediatr Transplant **12**(6): 650-5.
- Zieman, S. J., V. Melenovsky, et al. (2005). "Mechanisms, pathophysiology, and therapy of arterial stiffness." Arterioscler Thromb Vasc Biol **25**(5): 932-43.
- Zuba-Surma, E. K., Y. Guo, et al. (2011). "Transplantation of expanded bone marrow-derived very small embryonic-like stem cells (VSEL-SCs) improves left ventricular function and remodelling after myocardial infarction." J Cell Mol Med **15**(6): 1319-28.